
Charakterisierung der durch Internalin A vermittelten Signaltransduktion in Epithelzellen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Roman Fischer
aus Cloppenburg

1. Referent:

2. Referent:

eingereicht am:

mündliche Prüfung (Disputation) am:

Druckjahr 2008

Prof. Dr. Jürgen Wehland

Prof. Dr. Michael Steinert

17.12.2007

05.05.2008

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

R. Fischer, J. Wissing, G. Dieterich, T. Reinl, H. Daub, J. Wehland, L. Jänsch:

Phosphoproteome Analyses at Proteinkinases: Application to the InlA mediated Signal Transduction and receptor turn-over of E-cadherin. (Poster) PhD Meeting 2005, Braunschweig

R. Fischer, J. Wissing, C. Hundertmark, F. Klawonn, T. Reinl, H. Daub, J.

Wehland, L. Jänsch: E-cadherin-related protein phosphorylation – a systematic approach. (Poster) Gordon Research Conference on Phosphorylation & G-Protein mediated Signaling Networks 2006, Biddeford, USA

R. Fischer: Quantitative Phosphoproteomics predicts Kinase activities involved in E-cadherin signalling. (Vortrag) Chemical Genomics Workshop 2007, Braunschweig

R.Fischer, J. Wehland, L. Jänsch: The E3-Ubiquitin-Ligase Hakai is involved in

the Internalin A-dependent Endocytosis of *Listeria monocytogenes*. (Poster) Dundee Cell Signalling Symposium on The Interplay between Protein Phosphorylation and Ubiquitination in Cell Signalling 2007, Dundee, UK

R. Fischer: The Internalin A-dependent uptake of *Listeria monocytogenes*. (Vortrag)

Wittenberger Arbeitstreffen Infectivity and Host Cells 2007, Wittenberg

Inhalt

1.	Einleitung	5
1.1	Wirt-Pathogen Interaktionen	5
1.1.1	Das pathogene Bakterium <i>Listeria monocytogenes</i>	9
1.1.2	Der Infektionszyklus und die Virulenzfaktoren von <i>Listeria monocytogenes</i>	11
1.1.3	Die Endozytose von <i>Listeria monocytogenes</i>	15
1.1.4	Internalin A	16
1.2	Das zelluläre Adhäsionsmolekül E-cadherin	18
1.2.1	Der Aufbau des E-cadherin-Komplexes	20
1.2.2	Die Endozytose des E-cadherin-Komplexes	21
1.3	Quantitative Methoden in der Proteomforschung	23
1.3.1	Methoden zur quantitativen Massenspektrometrie	25
1.3.2	iTRAQ™	27
2.	Ziele der Arbeit	31
3.	Material und Methoden	32
3.1	Chemikalien und Materialien	32
3.1.1	Puffer	32
3.2	Mikrobiologische Arbeitsmethoden	33
3.2.1	Bakterienstämme	33
3.2.2	Plasmide	33
3.2.3	Kulturmedien und Antibiotika	34
3.2.4	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	35
3.2.5	Kultivierung von <i>Listeria</i>	35
3.3	Zellbiologische Arbeiten	35
3.3.1	Zelllinien	35

	Inhalt
3.3.2 Medien und Zusätze	36
3.3.3 Stickstoffeinlagerung und Kulturbedingungen	36
3.3.4 Passagieren von Zellen	36
3.3.5 Induktionsexperimente	37
3.3.6 RNA-Interferenz	37
3.3.7 Inhibition der proteosomalen Proteindegradation	38
3.3.8 Nachweis der Endozytose von E-cadherin nach InIA-Stimulation	38
3.3.9 <i>In vitro</i> -Infektionsexperimente	39
3.4 Biochemische Arbeiten	40
3.4.1 Präzipitation von Proteinen nach Wessel-Flügge	40
3.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford	40
3.4.3 Denaturierende Gelelektrophorese (SDS-Page)	41
3.4.4 Protein-Färbemethoden	41
3.4.5 Semi-dry Blot	43
3.4.6 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	43
3.4.7 Aufreinigung von Strep-Tag II-Fusionsproteinen	43
3.4.8 Anreicherung von phosphorylierten Proteinen durch „Immobilized Metal Affinity Chromatography“ (IMAC)	44
3.4.9 <i>In vitro</i> Kinase Assay	44
3.5 Immunologische Arbeiten	45
3.5.1 Antikörper	45
3.5.2 Immunodetektion und Chemilumineszenz	46
3.5.3 Immunopräzipitation von Proteinen	46
3.6 Massenspektrometrische Arbeiten	47
3.6.1 Probenvorbereitung nach Gelelektrophorese	47
3.6.2 Aufreinigung und Entsalzen von Peptiden	48
3.6.3 Subfraktionierung von Peptiden durch Ionenaustausch- Chromatographie	48
3.6.4 Proteinidentifikation durch ESI-Q-TOF-MS	49
3.6.5 Proteinidentifikation durch HPLC-MS	49

	Inhalt
3.6.6	Proteinquantifizierung mit iTRAQ™ 50
3.6.7	Datenanalyse von Massenspektren 50
3.6.8	Identifikation von putativ aktivierten Kinasen durch "Text-Mining" 51
4.	Ergebnisse 52
4.1	Untersuchungen zur massenspektrometrischen Proteinquantifizierung durch iTRAQ™ 52
4.1.1	Häufigkeit der Detektion falsch-positiver iTRAQ™-Reporter 53
4.1.2	Das Verhalten von iTRAQ™-Reportern in nicht-regulierten Proben 55
4.1.3	Das Rauschverhalten der iTRAQ™-Reporter 57
4.1.4	Die Validierung des Rauschmodells 59
4.1.5	Untersuchungen zur Reaktionskinetik von iTRAQ™-Reagenzien 62
4.2	Systematische Analyse von durch Internalin A Stimulation aktivierbarer Kinasen 66
4.2.1	Identifikation und Quantifizierung phosphorylierter Proteine 68
4.2.2	Ermittlung potentieller „Upstream“-Kinasen 69
4.3	Untersuchungen zu Internalin A abhängigen Endozytose von <i>Listeria monocytogenes</i> 71
4.3.1	Inhibition der lysosomalen und proteosomalen Proteindegradation durch MG132 72
4.3.2	Der Einfluss von MG132 auf die Infektionseffizienz von <i>Listeria monocytogenes</i> 74
4.3.3	Ermittlung der c-SRC abhängigen Phosphorylierungsstelle im p120 catenin Interaktionsbereich von E-cadherin 75
4.3.4	InIA induzierte Endozytose von E-cadherin 81
4.3.5	InIA induzierte Phosphorylierung von Komponenten des E-cadherin-Komplexes 84
	Phosphorylierung von β -catenin an S45 84

	Inhalt
Phosphorylierung von E-cadherin an Y753	86
4.3.6 Reduktion der Hakai-Expression mittels RNA-Interferenz	87
4.3.7 Der Einfluss von Hakai auf die Infektionseffizienz von <i>Listeria monocytogenes</i>	89
5. Diskussion	92
5.1 Die Verwendung von iTRAQ™ zu massenspektrometrischen Quantifizierung von Proteinen	92
5.1.1 Die biochemische Charakterisierung der iTRAQ™-Reagenzien	92
5.1.2 Die Anwendbarkeit von iTRAQ™ zur Regulationsanalyse von Proteinen	99
5.2 Identifizierung und Quantifizierung phosphorylierter Proteine und ihrer Kinasen nach Internalin A Stimulation	101
5.3 Die Internalin A vermittelte Endozytose von <i>Listeria monocytogenes</i>	104
5.3.1 Src phosphoryliert E-cadherin an Tyrosin 753	107
5.3.2 Die Phosphorylierung von Komponenten des E-cadherin Komplexes nach Internalin A Stimulation	110
5.3.3 Die Rolle von Hakai, Proteasom und Lysosom bei der Invasion durch <i>Listeria monocytogenes</i>	114
5.3.4 Modell der InIA vermittelten Invasion von <i>Listeria monocytogenes</i>	117
6. Zusammenfassung	122
7. Ausblick	124
8. Literatur	127

1. Einleitung

1.1 Wirt-Pathogen-Interaktionen

Bakterien sind ubiquitär verbreitete Mikroorganismen und können als parasitäre Pathogene höhere Organismen befallen. Beim Menschen können Bakterien Krankheiten wie Lungenentzündung, Cholera oder Tuberkulose auslösen. Mit geschätzten 4 Millionen (WHO) Todesfällen pro Jahr sind Atemwegserkrankungen die häufigste Todesursache im Bereich der Infektionskrankheiten. Reisen und der Austausch von kontaminierten Blut-Produkten fördern und ermöglichen die weltweite Verbreitung von Infektionskrankheiten. Weiterhin steigt die Anzahl von multiresistenten Pathogenen in den letzten Jahren stetig. Zusammen mit inkonsequentem Impfverhalten in den Industrienationen führen diese Entwicklungen zur Verbreitung lange besiegt geglaubter Infektionskrankheiten wie der Tuberkulose (*Mycobacterium tuberculosis*, WHO Report 2007).

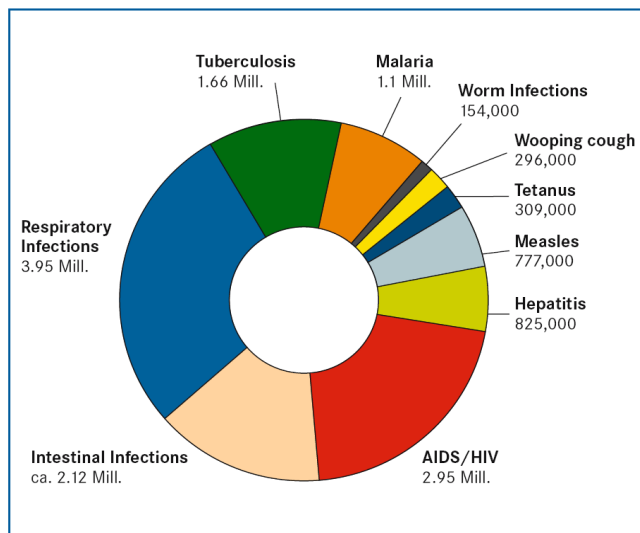


Abb. 1.1 Infektionskrankheiten weltweit

Mit fast vier Millionen Todesfällen weltweit sind Atemwegs-Infektionen gefolgt von HIV und Infektionen des Darms die häufigste Todesursache im Bereich der Infektionskrankheiten (Quelle: PathoGenoMik Report 2003)

Allgemein lassen sich Infektionskrankheiten durch Abwehrreaktionen des befallenen Organismus erkennen. Bei eingeschränkter Funktion des Immunsystems (Alter, AIDS, Suppression) kommt es zu verminderten Abwehrreaktionen, was die Diagnose und Bekämpfung von Infektionskrankheiten erschweren kann. Krankheitserreger können über Wunden in der Haut, die Atemluft oder die Nahrung aufgenommen werden. Innerhalb des Körpers können sich Krankheitserreger auf vielfältige Weise verbreiten und vermehren. Ein Schlüsselereignis bei einer Infektion durch viele

Erreger ist seine Adhäsion an Zellen des Wirtsorganismus. Während einige Pathogene ihre Aufnahme in die Wirtszelle einleiten (zB. *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Salmonella typhi*) bleiben andere Bakterien außerhalb der Wirtszelle haften (zB. *Vibrio cholerae* und *Neisseria gonorrhoeae*). Ein wichtiger Faktor bei der Pathogenese ist die Anzahl aufgenommener Keime. Die Zahl ist von Pathogen zu Pathogen verschieden. So genügen weniger als 100 Zellen des Pathogens EHEC, um eine Infektion auszulösen (Singleton, 2004).

Bei einer oralen Aufnahme von Krankheitserregern, müssen die Keime verschiedene Barrieren und Abwehrmechanismen im Körper überwinden. Falls Keime die Magenpassage überleben, müssen sie antimikrobiellen Peptiden (Defensine) widerstehen, welche im Gewebe des Dünndarmes ausgeschüttet werden. Eine weitere Barriere ist die Darmflora. Die dort ansässigen Bakterien sekretieren weitere Bacteriocide, welche konkurrierende Bakterien abtöten können.

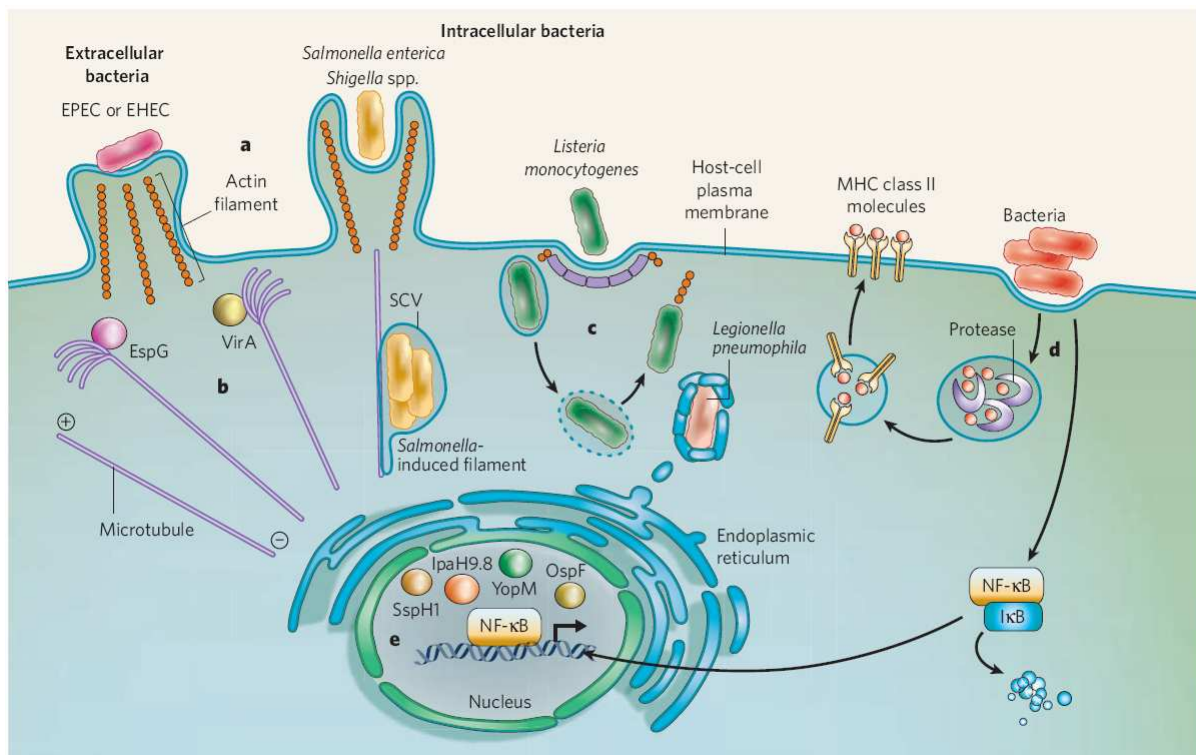


Abb 1.2 Adhäsion und Aufnahmewege verschiedener Bakterien Bakterien verwenden verschiedene Wege zur Aufnahme und Adhäsion in die Wirtszelle. Dabei werden elementare zelluläre Vorgänge wie die Reorganisation des Actin Zytoskeletts durch bakterielle Effektoren initiiert und gesteuert (Quelle: Bhavsar, 2007).

Die für eine Infektion entscheidende Interaktion zwischen bakteriellem Pathogen und Wirt ist die Ausbildung eines Adhäsionskomplexes. Zur Ausbildung einer stabilen Verbindung besitzen Pathogene in der Regel Strukturen oder Moleküle auf ihrer Oberfläche, die unter dem Begriff Adhäsine zusammengefasst werden. Adhäsine binden auf der Wirtsseite spezifisch an Rezeptormoleküle in der Zellmembran und an die extrazelluläre Matrix. Die Pathogene *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi* und *Yersinia enterocolitica* binden an Integrine in Epithel-Zellen. Integrine gehören zu den Glycoproteinen und vermitteln normalerweise den Kontakt einer Zelle zu Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen und Fibronektin. In vielen Fällen resultiert die Bindung eines bakteriellen Adhäsins nicht nur im Aufbau einer stabilen Bindung zur Wirtszelle, sondern auch in komplexen Veränderungen innerhalb der Zelle (Abb. 1.2). So führt die Bindung des Pathogens EPEC an Zellen des Darm-Epithels zur verstärkten Expression von Komponenten des Typ III-Sekretions-Systems, wodurch EPEC das Protein Tir in die Membran der Wirtszelle sekretieren kann. An Tir kann nun das EPEC Adhäsint Intimin binden. Diese Bindung führt zu Neuformierung des Actin-Zytoskeletts der Wirtszelle, wodurch sich sogenannte Pedestals bilden an denen das Bakterium haftet. Pathogene sind also in der Lage, gezielt Mechanismen in der Wirtszelle auszulösen, die ihrer eigenen Lebensweise förderlich sind.

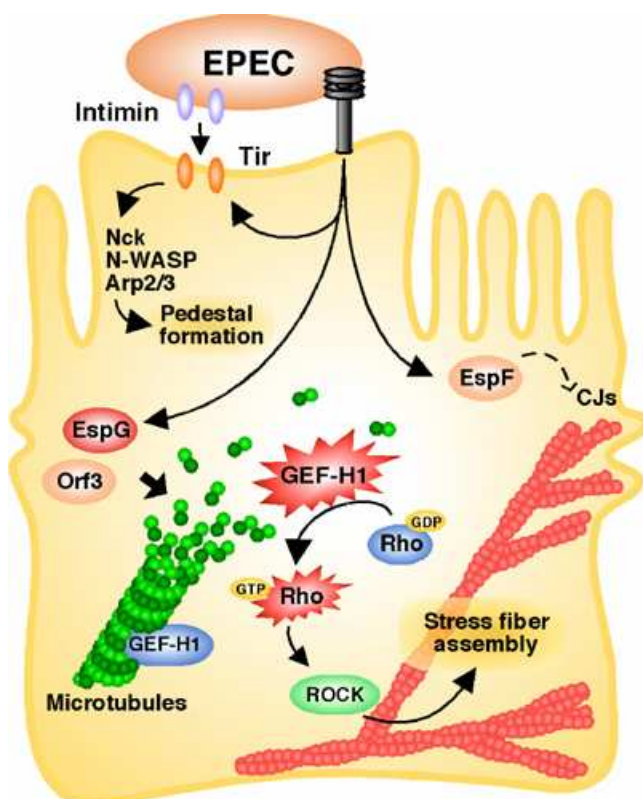


Abb. 1.3 Infektionsweg des Bakteriums EPEC EPEC bindet mit dem Adhäsionsprotein Intimin an den zellulären β -Integrin Rezeptor und injiziert das Protein Tir, welches nach Phosphorylierung Komponenten des Arp2/3-Komplexes rekrutiert. Dies führt lokal zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und zur Ausbildung sogenannter „Pedestals“, auf denen die Bakterien haften (Quelle: Matsuzawa et al., 2004).

Einige Pathogene induzieren nach ihrer Adhäsion die Aufnahme in die Wirtszelle. Normalerweise geht der Prozess der Internalisierung mit Veränderungen des Aktin-Gerüsts in der Wirtszelle einher. Auf diese Weise entkommen die Bakterien verschiedenen Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus und können nur durch Antibiotika bekämpft werden, welche in die Wirtszellen eindringen können. Bei der Aufnahme von Bakterien in Wirtszellen unterscheidet man zwischen verschiedenen Mechanismen. Beim „Trigger“-Mechanismus wird ein bakterielles Effektor-Protein in die Wirtszelle injiziert. Dieser Vorgang führt zur Aktivierung verschiedener Wirtszell-Signalwege, welche die Struktur des Aktin-Zytoskeletts beeinflussen. Die Umorganisation von Aktin-Filamenten führt zu Ausstülpungen der Wirtszell-Membran („membrane ruffling“) und zum schnellen Einschluss des Bakteriums in ein Phagosom. Der Trigger-Mechanismus wird zB. von *Salmonella* und *Shigella* eingeleitet, während *Yersinia* und *Listeria* den Zipper-Mechanismus anwenden. Dabei binden bakterielle Oberflächen-Adhäsine an Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle. Das führt zur Ausbildung zahlreicher Kontakte zwischen Bakterium und Wirt („Zippering“), der Aktivierung von Signalwegen in der Zelle und schließlich zur aktiven Aufnahme des Bakteriums.

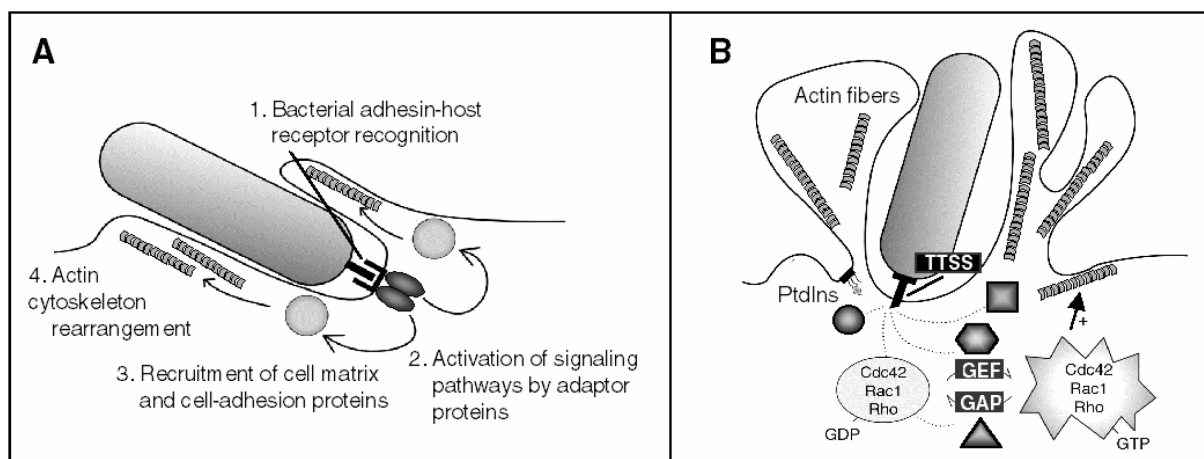


Abb. 1.4 Mechanismen von bakteriellen Pathogenen A) „Zipper“-Mechanismus: Das Bakterium induziert seine Aufnahme von außen durch die Bindung von bakteriellen Proteinen an Adhäsions- und andere Membran-Proteine der Wirtszelle. Die Interaktion aktiviert diverse Signalwege und führt zur Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts. B) „Trigger“-Mechanismus: Die Aufnahme des Bakteriums wird durch die Injektion bakterieller Effektor-Proteine in die Wirtszelle eingeleitet. Die Effektor-Proteine aktivieren verschiedene Signalwege und eine Reorganisation des Aktin Zytosketts (Quelle: Alonso et al., 2004).

Das Verständnis der Funktionen mikrobieller Virulenzfaktoren und der molekularen Interaktionen zwischen Pathogen und Wirt ermöglicht eine gerichtete Entwicklung von Agenzien zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten. Die generellen Prinzipien und Mechanismen von Infektionskrankheiten werden an Modell-Organismen erforscht. Dabei ist es das Ziel der Grundlagenforschung, jeden einzelnen Schritt der Infektion auf molekularer Ebene zu verstehen. Zusätzlich erhofft man sich, Einblicke in grundlegende biologische Prozesse in der Zelle zu erhalten.

1.1.1 Das pathogene Bakterium *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes gehört zu den Gram-positiven, nicht-sporenbildenden, fakultativ anaeroben, regelmäßig geformten Stäbchen. Das human- und tierpathogene Bakterium ist nach seinem Entdecker Joseph Lister und der häufig bei Infektionen auftretende Vermehrung von Monozyten (Monozytose) benannt. *Listeria* ist ein ubiquitär vorkommendes Bakterium, welches auf pflanzlichem Material und in Boden- und Wasserproben nachgewiesen werden kann. Listerien können im Temperaturbereich von 4 – 50 °C unter anaeroben und aeroben Bedingungen und bei hohen Salzkonzentrationen wachsen (Junttila, 1989). Zur Gattung *Listeria* gehören vier apathogene Arten (*L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welsheri*, *L. grayi*) sowie die zwei fakultativ pathogene Arten *Listeria ivanovii* und *Listeria monocytogenes*. Die Genome von *L. monocytogenes* und *L. innocua* wurden 2001 vom Europäischem Listerien Konsortium entschlüsselt (Glaser, 2001). Das Genom beider Arten besteht aus etwa drei Mio. Basenpaaren. Für *L. monocytogenes* wurden 2853 Gene und für *L. innocua* 2973 Gene annotiert, wobei 270 Gene spezifisch für *L. monocytogenes* und 149 für *L. innocua* sind.

Aufgrund der hohen Toleranz gegenüber extremen pH-Werten und hohen Salzkonzentration und dem wahlweise anaeroben oder aeroben Wachstum selbst bei Temperaturen um 4°C stellen Kontaminationen mit *Listeria monocytogenes* ein Problem in der Lebensmittel verarbeitenden Industrie dar. Listerien kontaminieren im Kühlschrank Fleisch- und insbesondere Rohmilch-Produkte. Eine Aufnahme kontaminierter Lebensmittel kann noch nach 8 Wochen zur Ausbildung einer Listeriose führen. Dabei treten zunächst Grippe-ähnliche Symptome auf. Bei immun-

kompromittierten Patienten kann es infolge einer Infektion zu Meningitis und Meningoenzephalitis kommen. Eine perinatale Infektion kann zu Frühgeburt und schweren Schädigungen bzw. zum Abort des Fötus führen. Auch bei einer Behandlung mit Antibiotika führt eine Infektion mit Listerien in 20-30 % aller Fälle zum Tode (Vazquez-Boland, 2001). Erreichen die Bakterien das Gehirn beträgt die Mortalität 70%. In Deutschland wurden im Jahr 2005 519 Fälle von Listeriose gemeldet (Koch et al., 2005). Mit 139 Todesfällen starben 2005 mehr Menschen in Deutschland an Listeriose als an Infektionen mit *Salmonella* (55000 gemeldete Erkrankungen).

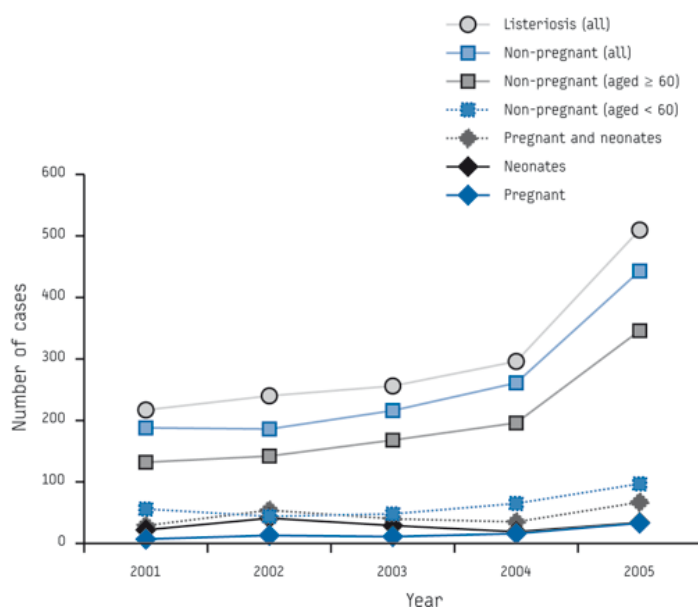


Abb. 1.4 Entwicklung der Anzahl gemeldeter Listeriose-Erkrankungen zwischen 2001 und 2005 in Deutschland Während die Anzahl der Listeriosen bei Neugeborenen zwischen 2001 und 2005 nahezu konstant blieb, ist die Anzahl bei Menschen ab 60 Lebensjahren stark angestiegen. In der Altersgruppe 20-39 Jahre erkrankten überwiegend Frauen, in den anderen Altersgruppen Männer. Die Mortalität betrug im Jahr 2005 26,8% (Quelle: Koch et al., 2005).

Die hohe Mortalität von Listeriosen liegt darin begründet, dass *Listeria monocytogenes* dazu in der Lage ist, die Aufnahme in Wirtszellen zu induzieren und so der humoralen Immunabwehr zu entkommen. Nach der Aufnahme von *Listeria* in einen Organismus über kontaminierte Nahrung, können die Bakterien das Darmepithel überwinden und in den Blutkreislauf gelangen. Listerien haben zudem die Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke sowie die Plazenta-Schranke zu überwinden und können so die oben beschriebenen Krankheitsbilder verursachen.

1.1.2 Der Infektionszyklus und die Virulenzfaktoren von *Listeria monocytogenes*

Nach der Aufnahme von Listerien mit kontaminierter Nahrung und der Magenpassage bindet das Bakterium an Epithel-Zellen des Verdauungstraktes. Die Bindung wird durch verschiedene Proteine auf der Oberfläche der Bakterien vermittelt. Die Proteine, welche im wesentlichen die Bindung an die Wirtszelle ermöglichen sind Internalin A und Internalin B, wobei Internalin A an das Zell-Zell-Adhäsionsprotein E-cadherin und Internalin B an die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met bindet und so zelluläre Prozesse einleitet, welche zur Phagozytose in die Wirtszelle führen. Das Bakterium wird durch Macropinozytose in eine primäre Vakuole (Phagosom) eingeschlossen. Durch die Sezernierung des Proteins Listeriolysin (LLO), eines hämolytischen Zytolysins, und der Phosphatidyl-spezifischen Phospholipase A (PlcA) wird das Phagosom zersetzt. Im Zytosol können sich die freigesetzten Listerien vermehren, während LLO wegen der Präsenz einer PEST-Sequenz (Pro, Glu, Ser, Thr) ubiquitiniert und degradiert wird. Nach der Teilung des Bakterium rekrutiert es am neu entstandenen Zellpol zelluläres Aktin. Der listerielle Aktin-Nucleator ActA bindet Komponenten des Arp2/3-Komplexes. Die Polymerisation von Aktin an einem Pol von *Listeria* ermöglicht es dem Bakterium sich ungerichtet in der Zelle zu bewegen. Trifft es auf die Zellmembran, bilden sich lokale Ausstülpungen („Protrusions“) bis hinein in eine Nachbarzelle. Diese Ausstülpungen können sich von der Mutterzelle abschnüren, so dass das Bakterium von einer Doppelmembran umgeben ist. Durch die Sekretion der Phosphatidylcholin (Lezithin)-spezifischen Phospholipase C (PlcB) und Listeriolysin (LLO) entkommt *Listeria* dieser Doppelmembran und beginnt mit einem neuen Infektionszyklus in der Nachbarzelle. Diese Strategie ermöglicht es *Listeria* sich horizontal in einem Gewebe auszubreiten, ohne mit dem extrazellulären Raum in Kontakt treten zu müssen. Damit sind die Bakterien vor einer humoralen Immunantwort des Wirts-Organismus geschützt und somit nicht durch Antikörper oder Granulozyten angreifbar. Weiterhin ist auf diese Weise eine Überwindung von zellulärer Barrieren möglich.

Als Virulenzfaktor gelten alle Proteine von Erregern, welche eine Infektion ermöglichen, oder diese direkt fördern. Als einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *Listeria monocytogenes* gilt das Protein PrfA. PrfA ist der Hauptregulator der

Virulenzgen-Expression in *Listerien* und gehört zur Familie der Crp/Fnr Transkriptionsfaktoren (Brehm et al., 1996). Das Protein bindet an eine 14 Aminosäuren lange, palindromische Sequenz („PrfA-Box“) im bakteriellen Genom, und induziert die Expression von Komponenten des Virulenzgen-Clusters von *Listeria monocytogenes*. Insgesamt weisen 286 Gene von *Listeria monocytogenes* eine putative PrfA-Box auf. Die Expression von PrfA selbst ist temperaturreguliert. Bei Temperaturen von unter 37°C liegt die mRNA von PrfA in gefaltetem Zustand vor und blockiert somit die Translation durch die Ribosomen in ein funktionelles Protein. Erhöht sich die Umgebungstemperatur auf 37°C entfaltet sich die mRNA, so dass PrfA synthetisiert werden kann und seinerseits die Transkription der Virulenzgene induziert. Eine verstärkte PrfA-Synthese kann auch bei Stress und Hunger-Bedingungen induziert werden. Die diesem Vorgang zugrundeliegenden Mechanismen sind bisher unvollständig charakterisiert.

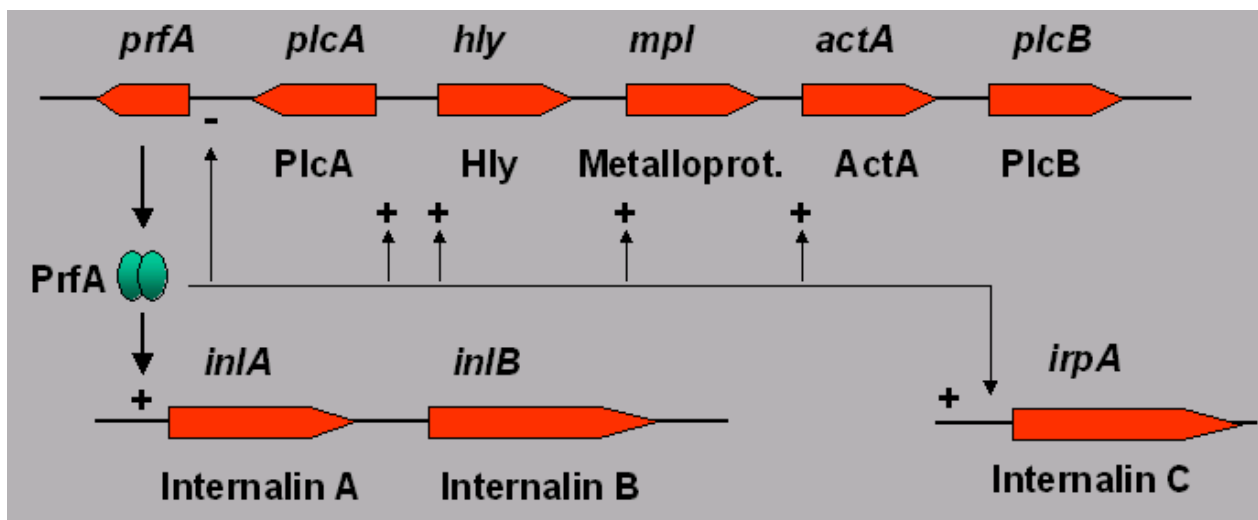


Abb 1.7 Der Virulenzgencluster von *Listeria monocytogenes* Das Regulatorprotein PrfA induziert bei einer Umgebungstemperatur von 37°C die Expression verschiedener Gene, welche zur pathogenen Lebensweise des Bakteriums nötig sind. Das *prfA*-Gen ist durch eine negative Rückkopplung reguliert (Quelle: Matthias Trost, Universität Montreal).

Der Virulenzgencluster von *Listeria monocytogenes* umfasst die Gene *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB*. Weiterhin reguliert PrfA die Internalingene *inlA*, *inlB*, *irpA* und in einer negativen Rückkopplung das *prfA*-Gen (Abb. 1.7).

Die Phospholipasen PlcA und PlcB sind essentiell für das Entkommen des Bakteriums aus dem primären bzw. sekundären Phagosom. Die Metalloprotease Mpl ist für die Aktivierung von PlcA notwendig. Listeriolysin (LLO / Hly) wird ebenfalls für das Entkommen des Bakteriums aus dem Phagosom benötigt, jedoch wurden weitere Funktionen für dieses Protein beschrieben (Übersicht von Kayal et al., 2006). Neben seiner Rolle bei der Porenbildung im Phagosom induziert LLO verschiedene Signalwege, die zu einer Aktivierung von NF- κ B und zur Dephosphorylierung von Histon H3 sowie die Deacetylierung von Histon H4 (Hamon et al., 2007) führen. Beide Mechanismen haben Einfluss auf die Transkription von Wirtszellgenen. Weiterhin wurde im Zusammenhang mit der Porenbildung die Aktivierung der Map-Kinase Kaskade durch LLO beobachtet (Tang et al., 1996). Am Beispiel von LLO wird damit deutlich, dass bakterielle Proteine in der Wirtszelle vielfältige Funktionen haben können und insbesondere Einfluss auf die Induktion von Signalwegen und Proteinexpression in der Wirtszelle haben können.

Das listerielle Oberflächenprotein ActA imitiert die Funktion der WASP-Wirtszellproteinfamilie (May et al., 1999), um die Aktin-Polymerisations-Maschinerie der Wirtszelle für die Fortbewegung auf einem sogenannten Aktinschweif innerhalb der Wirtszelle zu ermöglichen (Abb. 1.8).

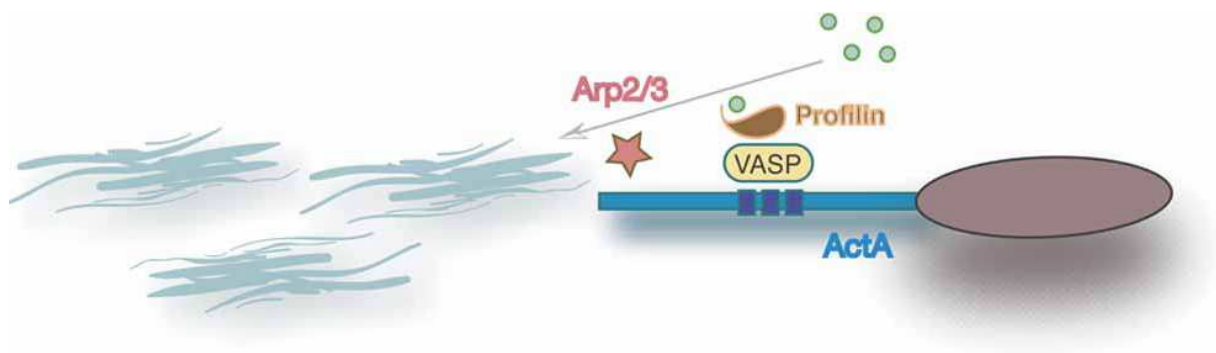
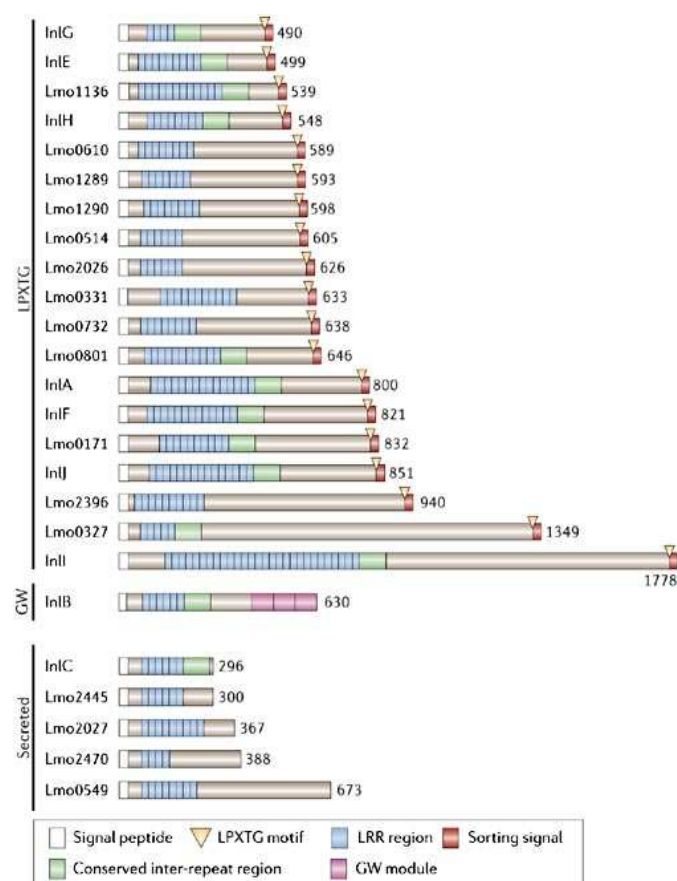


Abb. 1.8 Intrazelluläre Fortbewegung von *Listeria monocytogenes* Im Zytosol der Wirtszelle rekrutiert das listerielle Oberflächenprotein ActA Komponenten der Aktin Polymerisationsmaschinerie. Dadurch bildet sich ein Aktinschweif aus, den *Listeria* zur intra- und interzellulären Fortbewegung nutzt (Quelle: Pizarro-Cerdá, 2006).

Die Proteinfamilie der Internaline besteht aus insgesamt 25 Proteinen (Hamon et al., 2006). Sie lassen sich je nach Lokalisation in drei Untergruppen einteilen (Abb. 1.9).

LPXTG-Proteine sind kovalent mit der Zellwand des Bakteriums verknüpft, während die zweite Gruppe, welche nur aus Internalin B besteht, über ein GW-Modul an die Zellwand gekoppelt ist. Die dritte Gruppe der Internaline weist keine Zellwand-Verbindung auf und wird sekretiert. Alle Internaline haben neben einem N-terminalen Signalpeptid Leucin-reiche Bereiche („Leucin rich repeats“, LRR), die sich je nach Internalin mit verschiedener Anzahl wiederholen. In einigen Fällen schließt sich ein konservierter „Inter-repeat“ Bereich (IR) an. Bei den in der Zellwand kovalent verankerten Internalinen folgen die Aminosäuren LPXTG, eine hydrophobe Transmembranregion und eine Signalsequenz welche das Protein für den Einbau in die Membran markiert. Von den sekretierten Internalinen zeigt nur Internalin C eine IR-Sequenz.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

Abb. 1.9 Proteinfamilie der Internaline Internaline gliedern sich in drei Gruppen. LPXTG Proteine sind kovalent mit der bakteriellen Zellwand verknüpft, während Internalin B über ein GW-Modul an die Zellwand assoziiert ist. Die dritte Gruppe der Internaline wird sekretiert. Charakteristisch für Internaline ist die LRR-Region („Leucin-Rich-Repeat“), über die Internaline mit anderen Proteinen wechselwirken können (Quelle: Hamon et al., 2006).

Während die Internaline A und B zur Zeit am umfassendsten funktionell charakterisiert sind und Internalin C ebenfalls den listeriellen Virulenzfaktoren zuzuordnen ist, sind für die verbleibenden 22 Internalin-ähnlichen Proteine zur Zeit keine Bindungspartner oder Funktionen bekannt. Die räumliche Struktur der

Internaline, welche durch die LRRs bestimmt wird, legt jedoch eine spezifische Bindung zu einem Wirtszellprotein nahe. Auf die Struktur und Funktion von Internalin A wird in 1.1.4 näher eingegangen.

1.1.3 Die Endozytose von *Listeria monocytogenes*

Die Endozytose von *Listeria monocytogenes* wird im wesentlichen durch Internalin A und Internalin B eingeleitet. Internalin A bindet an das Adhäsionsmolekül E-cadherin. Dieser Mechanismus ist ausreichend, um zu einer Endozytose zu führen (Lecuit et al., 1997). Sousa et al. (2005) konnte zeigen, dass das Protein ARHGAP10 bei der Internalin A-abhängigen Endozytose von *Listeria* zum E-cadherin-Komplex rekrutiert wird. Die Autoren schlagen als Mechanismus zur Internalin A vermittelten Aufnahme von *Listeria* die durch das Motorprotein Myosin VII und Vezatin erzeugte Kraft vor, welche in der Zelle normalerweise einen Zug an der Nachbarzelle ausübt (Abb. 1.5). Küssel-Andermann et al. (2000) zeigten eine Kolo-kalisation des Transmembran-Proteins Vezatin und Myosin mit dem E-cadherin-Komplex und folgerten daraus, dass über diese Interaktion eine Zugkraft zwischen E-cadherin-Komplex und dem Aktin-Zytoskelett generiert wird, welche Zell-Zell-Kontakte stabilisiert.

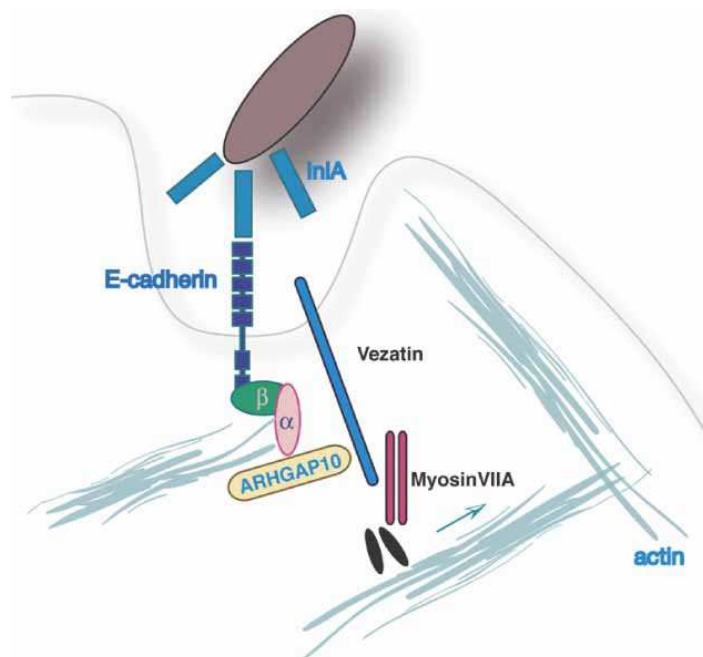


Abb. 1.5 Vorgeschlagener Mechanismus zur Internalin A vermittelten Endozytose von *Listeria monocytogenes* Die Bindung von Internalin A an E-cadherin führt in der Wirtszelle zur Rekrutierung des Adapterproteins ARHGAP10, welches über Vezatin und Myosin VIIA eine Kraft auf den E-cadherin-Komplex ausübt und zur Endozytose des Bakteriums führt (Quelle: Pizarro-Cerdá, 2006).

Das strukturell mit Internalin A eng verwandte Protein Internalin B ist ebenfalls hinreichend, um eine Aufnahme des Bakteriums zu ermöglichen. Internalin B bindet an eine andere Domäne der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met als der natürliche Ligand HGF („Hepatocyte Growth Factor“) (Shen et al., 2000). Als Ergebnis dieser Bindung findet eine Autophosphorylierung des Rezeptors statt, wodurch der c-Met Signalweg aktiviert wird (Abb. 1.6). Diese Signalkaskade führt zu einer lokalen Restrukturierung des Aktin-Zytoskelletts und schließlich zur Aufnahme des Bakteriums auch in nicht epitheliale Zellen.

Veiga et al. (2005) konnten zeigen, dass die Bindung von Internalin B an c-Met zu einer Phosphorylierungs-abhängigen Rekrutierung der Ubiquitin-Ligase c-Cbl und damit zu einer Monoubiquitinierung des Rezeptors führt. Die kovalente Verknüpfung einzelner Ubiquitin-Moleküle an eine oder mehrere Stellen bewirkt eine Rekrutierung von Clathrin-Molekülen und schließlich die Aufnahme des Rezeptors und des Bakteriums in ein Clathrin-Vesikel.

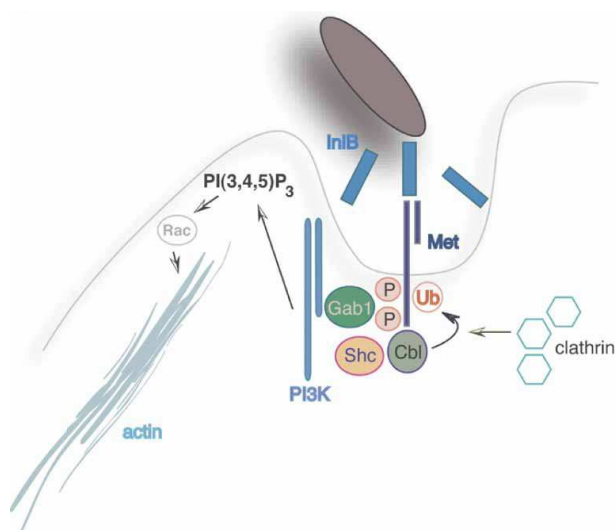


Abb. 1.6 Vorgeschlagener Mechanismus zur Internalin B vermittelten Endozytose von *Listeria monocytogenes*

Die Autophosphorylierung des c-Met Rezeptors nach der Bindung von Internalin B führt zur Aktivierung des PI3K Signalweges und zur Umstrukturierung des Aktin Zytoskelletts. c-Met wird durch c-Cbl ubiquitiniert und Clathrin-vermittelt endozytiert (Quelle: Pizarro-Cerdá, 2006).

1.1.4 Internalin A

Das listerielle Protein Internalin A konnte 1991 als erstes Protein, welches es *Listeria monocytogenes* erlaubt, nicht-phagozytotische Zellen zu infizieren, charakterisiert werden (Gaillard, 1991). Als Bindungspartner auf der Wirtsseite wurde das Zell-Zell-Kontakt vermittelnde Protein E-cadherin identifiziert (Mengaud, 1996). Die Interaktion zwischen E-cadherin und Internalin A reicht aus, um eine Adhäsion und anschließende Endozytose des Bakteriums einzuleiten. Internalin A bindet dazu an

die erste extrazelluläre Domäne von menschlichem E-cadherin. An murines E-cadherin kann InIA nicht binden, da dort ein für die Bindung nötiges Prolin an Stelle 16 der Aminosäuresequenz durch Glutamin ausgetauscht ist (Lecuit, 1999). Wollert et al. (2007) konnte eine Variante von Internalin A generieren, welche mit einer ähnlichen Affinität an murines E-cadherin binden kann wie wildtyp Internalin A an humanes E-cadherin. Die Affinität des mutierten Internalin A zu humanem E-cadherin wurde dabei um den Faktor 6700 gesteigert.

Internalin A gehört zu den LPXTG-Proteinen und ist somit in der Zellwand von *Listeria monocytogenes* kovalent verankert. Zwischen Aminosäure 79 und 414 befinden sich 15,5 Wiederholungen einer Sequenz aus 22 Aminosäuren („Leucin rich repeats“, LRR). Die Sichel-förmige 3-dimensionale Struktur (Abb. 1.11) wird durch aliphatische, hydrophobe Aminosäuren in jeder Wiederholung und die Ausrichtung Leucin-reicher Bereiche definiert. Die Interaktion mit E-cadherin kommt durch die LRR-Region des Proteins zustande (Schubert et al., 2002). Dabei bindet InIA an die C-terminale, extrazelluläre Domäne von E-cadherin. Die Bindung zwischen InIA und E-cadherin ist mit einer Bindungskonstanten von 8 μM stärker als die Bindung zwischen zwei E-cadherin Molekülen (64 μM). Beide Interaktionen sind Calcium-abhängig.

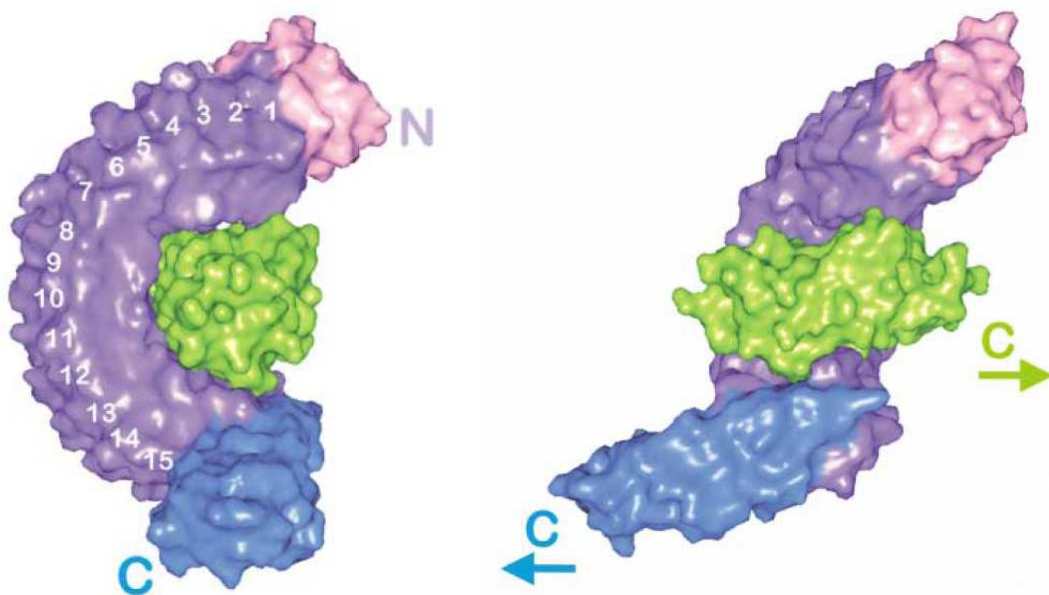


Abb 1.11 **Interaktion von Internalin A mit E-cadherin** Der LRR-Bereich von Internalin legt sich sichelförmig um die erste extrazelluläre Domäne von menschlichem E-cadherin (Quelle: Schubert et al., 2002).

1.2 Das zelluläre Adhäsionsmolekül E-cadherin

Das E-cadherin Gen befindet sich auf Chromosom 16 (16q22.1) und kodiert für eine 135 kDa großes Polypeptid mit 882 Aminosäuren (Bussemakers et al., 1993). Am C-Terminus befindet sich ein Signalpeptid und ein 155 Aminosäuren umfassendes Propeptid. E-cadherin gehört zu den klassischen Cadherinen, welche als Transmembranproteine benachbarte Zellen über Adapterproteine (α -, β -, und γ -catenin) am Zytoskelett miteinander verbinden. Sie spielen bei der dynamischen Kontrolle morphogener Prozesse in der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle. In adultem Gewebe sind Cadherine an der Erneuerung schnell wachsender Gewebe wie Darm oder Haut beteiligt, lassen sich in allen festen Geweben finden und bilden einen elementaren Bestandteil von Zell-Zell-Kontakten. Der Verlust der Cadherin-Expression oder –Funktion in Zellen lässt sich in vielen metastasierenden Krebsarten finden, weshalb Cadherine als Tumor-Suppressoren und Krebs-Marker gelten. Die Beteiligung von Cadherinen an vielen biologischen Prozessen spiegelt sich in der Anzahl der untersuchten zellulären Mechanismen wieder, die auf die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten Einfluss haben.

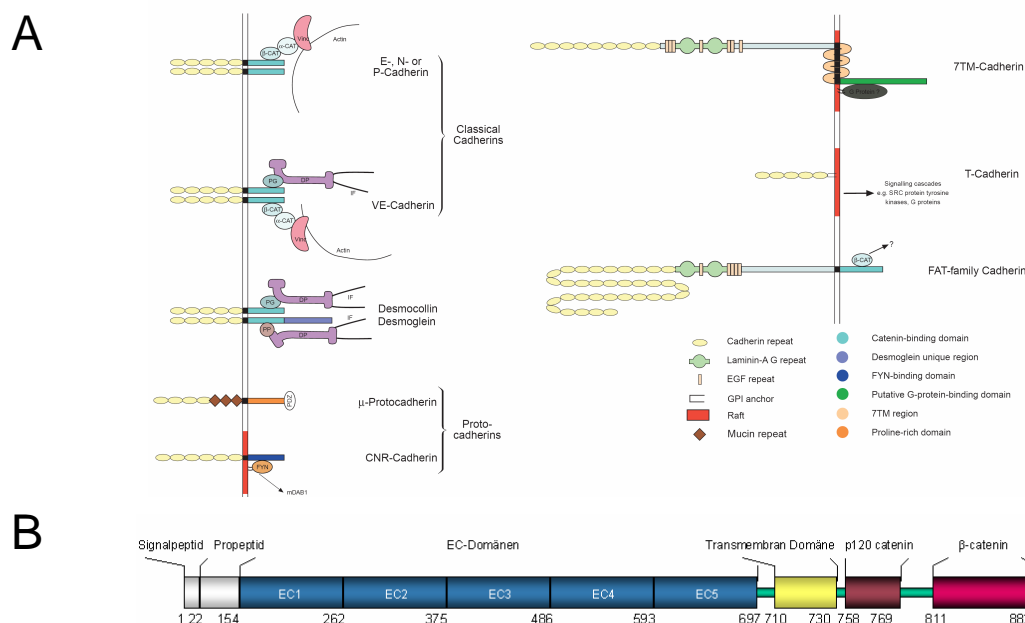
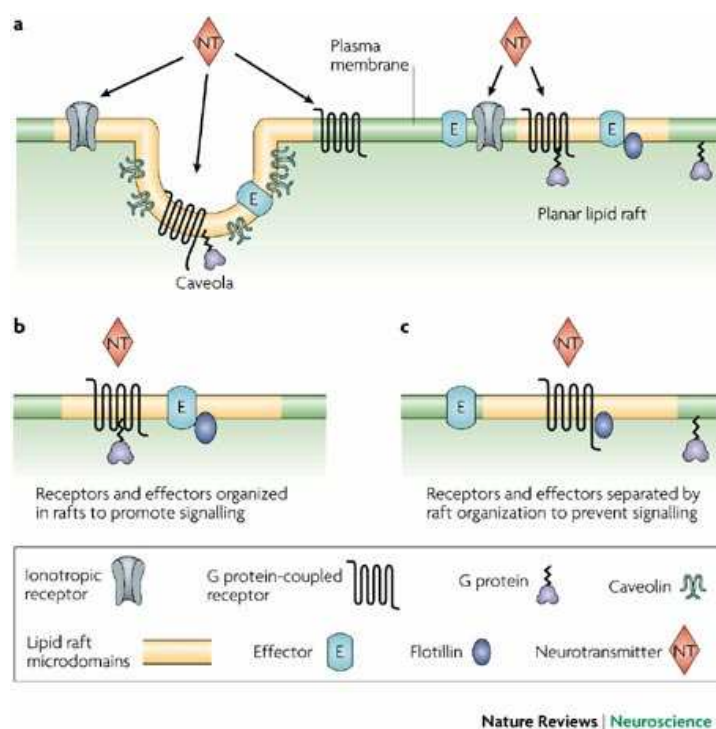


Abb. 1.12 Aufbau von Cadherin-Komplexen **A)** Schematische Darstellung der Cadherin Protein-Familie. E-cadherin gehört zu den klassischen Cadherinen, welche über die Adapterproteine Vimentin, α - und β -catenin an das Aktin-Zytoskelett assoziiert sind (Quelle: Angst et al., 2001). **B)** Domänenstruktur von E-cadherin. Das funktionelle E-cadherin umfasst die Aminosäuren 155 bis 882. An die extrazellulären EC-Domänen schließt sich der Transmembranbereich an, gefolgt von einer kurzen Sequenz, an welche p120 catenin bindet und dem Bereich an den β -catenin assoziiert.

E-cadherine können eine Calcium-abhängige homophile Verbindung zu den extrazellulären Bereichen von E-cadherin-Molekülen benachbarter Zellen eingehen. Der extrazelluläre Bereich von E-cadherin besteht aus 5 globulären Domänen (EC-Domänen, „Extracellular Cadherin“) aus 104 - 113 Aminosäuren, deren Struktur eine cis-Dimerisierung von benachbarten E-cadherin-Molekülen nahelegt (Shapiro et al., 1995). Jede Cadherin-Domäne enthält N-terminal das klassische Cadherin-Bindungsmotif mit den drei Aminosäuren Histidin-Alanin-Valin. Die Trans-Interaktion von E-cadherin-Molekülen benachbarter Zellen wird durch die N-terminale Domäne eingeleitet. Dabei entsteht eine Reißverschluss („Zipper“)-ähnliche Struktur. Die lineare Struktur der EC-Domänen wird durch die Einlagerung von Calcium zwischen den einzelnen Domänen ermöglicht. An die extrazelluläre Domäne schließt sich die 21 Aminosäuren lange Transmembrandomäne (Aminosäuren 710-730) gefolgt vom hochkonservierten intrazellulären Bereich des Proteins an. Nahe der Membran bindet das Protein p120 catenin (Aminosäuren 758-769), welches für die Stabilisierung des E-cadherin-Komplexes notwendig ist. Die Aminosäuren 731 bis zum C-Terminus an Position 882 befinden sich innerhalb der Zelle und bilden das Gerüst über welches E-cadherin indirekt mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden ist (Abb. 1.12). Diese Bindung wird durch β - und α -catenin vermittelt, wobei β -catenin E-cadherin und α -catenin verbindet. α -catenin wiederum bindet an Aktin, wobei Adapterproteine wie α -actinin, Spektrin und Vinculin zur Stabilität des Komplexes beitragen oder sie erst ermöglichen (Übersicht von Yamada, Geiger, 1997). β -catenin kann durch γ -catenin (Plakoglobin) substituiert sein. Die Funktion von E-cadherin beschränkt sich nicht nur auf die Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten in epithelialen Geweben, sondern beinhaltet auch die Regulation zellulärer Prozesse während der Differenzierung, Proliferation und Migration von Zellen (Übersicht von Knudsen, 1998). Weiterhin lassen sich Komponenten zahlreicher prominenter Signalwege in Bereichen besonders ausgeprägter Zell-Zell-Kontakte nachweisen. Die Präsenz von Rezeptortyrosinkinasen wie c-Met oder EGFR und anderer Signal-Moleküle wie Kinasen der Src-Familie und Phosphatasen in Zell-Zell-Kontakten unterstreichen die Relevanz von E-cadherin in Prozessen der Signal-Weiterleitung und der Regulation von Zell-Zell-Kontakten (Brady-Kalnay, 1995).

1.2.1 Der Aufbau des E-cadherin-Komplexes

Nach seiner Expression wird E-cadherin durch Glycosylierungen, Phosphorylierungen und Proteolyse zu einem Protein mit einem Molekulargewicht von 120 kDa modifiziert. Für E-Cadherin konnte gezeigt werden, dass die spätere zytoplasmatische Region zunächst von Casein Kinase an S840, S853 und S855 phosphoryliert wird (Lickert et al., 2000). Diese Phosphorylierung ermöglicht eine weitere Phosphorylierung von E-cadherin durch GSK3 β an S849. Erst dann kann β -catenin an E-cadherin binden, wonach der Proteinkomplex zur Membran transportiert wird (Wahl et al., 2003). Dort assoziiert β -catenin mit α -catenin und dem Aktin-Zytoskelett. Nahe der Membran wird p120-catenin zum E-cadherin Komplex rekrutiert (Aminosäuren 758 – 769). Durch eine homophile Interaktion von E-cadherinen bilden sich Dimere aus, welche Ca-abhängig an E-cadherin-Dimere aus benachbarten Zellen binden. Nach der Anlagerung weiterer E-cadherin Komplexe bilden sich Protein-Cluster, welche neben Adhäsionsmolekülen auch Signal-Komponenten wie die Kinasen Src oder c-Met enthalten können. Diese Superkomplexe werden auch als „Lipid rafts“ bezeichnet, weil sie als Einheit in der fluiden Lipid-Doppelmembran der Zelle schwimmen.



Im stabilen E-cadherin-Komplex bindet das Protein p120 catenin intrazellulär nahe der Membran. Die Tyrosin-Kinase Fer kolokalisiert mit p120 (Piedra et al., 2003) und phosphoryliert und aktiviert lokal die Protein-Phosphatase PTP1B, welche β -catenin dephosphoryliert (gezeigt für den N-cadherin Komplex von Xu et al., 2002). Die Bindung von β -catenin an E-cadherin wie auch α -catenin ist phosphorylierungsabhängig, so dass die Aktivierung von PTP1B die Assoziation des E-cadherin-Komplexes an das Aktin-Zytoskeletts aufrecht erhält.

1.2.2 Die Endozytose des E-cadherin-Komplexes

E-cadherin vermittelte Zell-Zell-Kontakte werden in Epithelzellen fortlaufend abgebaut und erneuert. Die Halbwertszeit von E-cadherin beträgt 5 Stunden (Zheng et al., 2005). Damit handelt es sich bei Zell-Zell-Kontakten nicht wie lange angenommen um statische Gebilde, sondern vielmehr um Proteinkomplexe, deren Zusammensetzung und Lokalisierung einer ständigen Veränderung unterliegen. Die Stabilität des E-cadherin-Komplexes hängt von der intrazellulären Assoziation mit dem Protein p120 catenin zusammen (1.2.1). Wird p120 aus dem Komplex entfernt, wird PTP1B nicht mehr lokal aktiviert und β -catenin kann durch die Kinasen Fer, Fyn oder c-Met an Y142 phosphoryliert werden (Piedra et al., 2003). Dies führt zum Verlust der Bindung an α -catenin. Src oder EGFR phosphorylieren β -catenin an Y654, was zur Dissoziation von E-cadherin führt (Lilien et al., 2005). Damit liegt β -catenin frei im Zytosol vor, wo es bei inaktivem Wnt-Signalweg zunächst von Casein Kinase an S45 phosphoryliert wird (Amit et al., 2002). Dies ermöglicht eine weitere Phosphorylierung durch GSK3 β an S33 und S37 (Sadot et al., 2002). Dieses Phosphorylierungsmuster führt zu einer Degradation von β -catenin im Proteasom.

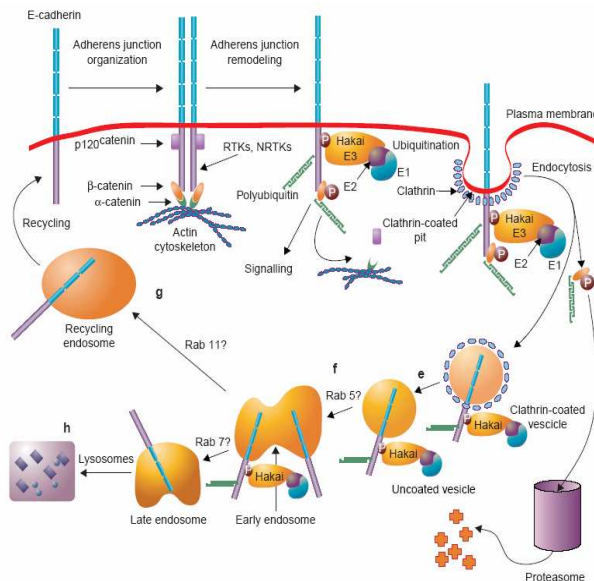


Abb. 1.14 Degradation und Endozytose des E-cadherin Komplexes Der erste Schritt bei der Endozytose von E-cadherin ist die Phosphorylierung in der p120 bindenden intrazellulären Region des Proteins. Dies führt zur Dissoziation von p120 und zur Rekrutierung der E3-Ubiquitin Ligase Hakei. Die Ubiquitinierung von E-cadherin führt zur Clathrin-vermittelten Endozytose von E-cadherin (Quelle: Pece, 2002).

Fujita et al. (2002) konnten zeigen, dass die Phosphorylierung der intrazellulären Domäne von E-cadherin durch eine transfizierte und Temperatur-aktivierbare Form der Kinase v-Src zu einem Verlust der Bindung zu p120 catenin führt und damit die Clathrin vermittelte Endozytose von E-cadherin eingeleitet wird (Abb. 1.14). Dazu erfolgte eine Phosphorylierung N-terminal der p120-Bindungsstelle an einem oder zwei von 3 aufeinanderfolgenden Tyrosinen. Durch Mutagenese konnte gezeigt werden, dass das dritte Tyrosin für die Endozytose von E-cadherin nicht relevant ist. Die Phosphorylierung von E-cadherin führt zu einer Dissoziation von p120. An phosphoryliertes E-cadherin kann die E3 Ubiquitin Ligase Hakei durch ihre verkürzte SH2-Domäne binden und ubiquitiniert E-cadherin. Die Art der Ubiquitinierung ist bisher uncharakterisiert doch ist es wahrscheinlich, dass eine Mono- oder Multi-Ubiquitinierung stattfindet, bei der an ein oder mehrere Lysine von E-cadherin ein Ubiquitin-Molekül angehängt werden. Die Mono- und Multi-Ubiquitinierung wird als Signal für die Clathrin-vermittelte Endozytose von integralen Membran-Proteinen – insbesondere Rezeptoren – angesehen (Übersicht von Höller et al., 2004). Initiiert durch den Sekundär-Botenstoff PIP₂ lagern sich Clathrin-Moleküle auf der intrazellulären Seite im Bereich des ubiquitinierten E-cadherins an und bilden einen sogenannten „Clathrin coated pit“ (Clathrin überzogene Vertiefung) um das zu endozytierende Protein. Im weiteren Verlauf bildet sich ein Clathrin-Vesikel in das E-cadherin eingeschlossen wird. Dieses Vesikel kann von der Zelle zurück zur Membran transportiert werden, wo E-cadherin erneut in einen funktionellen Adhäsions-Komplex eingebaut wird. Alternativ kann es auch zu einem Lysosom prozessiert werden, in dem eine Degradation des Proteins in seine Einzelbausteine

stattfindet. Palacios et al. (2005) konnten zeigen, dass für den Transport von E-cadherin in das Lysosom die Ubiquitinierung notwendig ist. Weiterhin wird das Protein Hrs benötigt, welches nach der Stimulation des HGF-Rezeptors c-Met phosphoryliert wird. Das Signal zur Endozytose von E-cadherin ist demnach die Phosphorylierung im p120-bindenden Bereich. Die Aktivierung von Src führt weiterhin zur Ubiquitinierung von E-cadherin durch Hakai und zur Aktivierung von Rab5, wodurch eine Fusion von Endosomen eingeleitet wird. Hrs bindet an ubiquitiniertes E-cadherin, was zur Weiterleitung von E-cadherin in das Lysosom führt, während nicht ubiquitiniertes E-cadherin zur Membran transportiert wird. Palacios et al. (2005) schlagen also vor, dass die Ubiquitinierung von E-cadherin weniger das Signal für die Endozytose als vielmehr als Signal für die Beförderung von E-cadherin in das Lysosom zu verstehen ist.

1.3 Quantitative Methoden in der Proteomforschung

Die Proteomforschung beschäftigt sich mit der Analyse aller zu einem Zeitpunkt und unter bestimmten Bedingungen präsenten und modifizierten Proteine einer Zelle oder eines Organismus. Während die genetischen Informationen eines Organismus nur in geringem Maße veränderlich sind, kann die Expression und Funktion von Proteinen abhängig von externen Faktoren (Temperatur, pH-Wert, Nährstoffbedingungen) sein. Durch enzymatische Modifikation können Proteine strukturell und in vielen Fällen damit auch funktionell verändert werden, so dass nicht nur quantitative Unterschiede auf Expressionsebene, sondern auch quantitative Unterschiede auf der Modifikationsebene von hoher Relevanz bei der funktionellen Proteomanalyse sind. Ein Teilgebiet der Proteomforschung umfasst die Interaktionen von Proteinen untereinander oder mit anderen in Organismen vorkommenden Molekülklassen, während die Strukturbiologie versucht, die 3-dimensionale Form von Proteinen und ihren Interaktionspartnern zu bestimmen. Quantitative Untersuchungen der in Zellen exprimierten Proteine komplementieren die Analyse der Expression auf genomischer Ebene. Komparative Analysen von Proteomen ermöglichen einen Vergleich zwischen Zellen in normalen mit Zellen in einem pathologischen Zustand. Dies kann zur Identifikation von Proteinen oder Protein-Modifikationen führen, welche

bei Krebserkrankungen eine Rolle spielen oder bei der Verbreitung von Krankheitserregern wichtig sind.

Für eine differentielle Quantifizierung und Identifizierung komplexer Proben bietet sich die klassische 2D-Gelelektrophorese an (O'Farrell, Klose, 1975), mit der sich bis zu >1000 Proteine aus komplexen Proteingemischen in einem Gel visualisieren und quantifizieren lassen. Eine Identifizierung erfolgt durch das „Mass-Fingerprinting“-Verfahren, bei dem das zu identifizierende Protein proteolytisch gespalten wird und die Fragmentmassen massenspektrometrisch bestimmt werden. Die Fragmentmassen sind für jedes Protein spezifisch, so dass ein Datenbankabgleich zu einer Identifizierung führen kann. Bei der differentiellen 2D-Gelelektrophorese („Differential In Gel Electrophoresis“, DIGE (Ünlu et al., 1997)) können verschiedene Proben in einem Gel verglichen werden indem sie vorher differentiell mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert und die Signalintensitäten nach spezifischer Anregung verglichen werden. Die differentiell markierten Proteine werden vereinigt und im gleichen 2D-Gel nach isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht aufgetrennt, so dass für jedes Protein exakt dieselben Bedingungen in beiden Dimensionen vorliegen. DIGE ist damit aktuell die bevorzugte Methode bei der Gel-basierten Protein-Quantifizierung. Die Nachteile Gel-basierter Methoden sind ein geringer dynamischer Bereich bei der Quantifizierung von Proteinen und ein geringes Auflösungsvermögen bei hydrophoben Proteinen sowie Proteinen mit hohem oder niedrigem Molekulargewicht oder isoelektrischem Punkt.

Eine Alternative zur Gelelektrophorese und anschließendem „Mass-Fingerprinting“ kann eine Identifizierung von Proteinen durch die HPLC-gekoppelte Massenspektrometrie (LC-MS/MS) sein. Dabei werden die Proteine in einem komplexen Proteingemisch proteolytisch gespalten und die Fragmente entsprechend ihrer chemischen Eigenschaften chromatographisch aufgetrennt. Peptide gleicher Aminosäure-Sequenz eluieren gleichzeitig von der Trennsäule und können automatisch durch ein Massenspektrometer fragmentiert werden. Der Datenbankabgleich der experimentell bestimmten Fragmentmassen mit theoretisch bestimmten Fragmentmassen des Proteomes des Ausgangsmaterials, führt zur Identifizierung der Aminosäuresequenz der fragmentierten Peptidspezies und damit zur Identifizierung des Mutterproteins. Eine direkte Quantifizierung zweier Proben ist

durch LC-MS jedoch nur eingeschränkt möglich, da die Intensität der massenspektrometrisch bestimmten Peptidsignale nicht mit der Abundanz des Peptids in der Probe korrelieren muss. Gründe dafür können coeluiierende Peptidspezies mit ähnlicher Masse sein, welche das Signal überlagern, oder sehr abundante und coeluiierende Peptide, welche die Ionisierung des zu quantifizierenden Signal einschränken (Ionensuppression). Um diese Einschränkungen zu umgehen, wurden verschiedene Methoden zur quantitativen Massenspektrometrie entwickelt, von denen die gebräuchlichsten im folgenden kurz beschrieben werden.

1.3.1 Methoden zur quantitativen Massenspektrometrie

Die Grundlage für eine massenspektrometrische Quantifizierung von Proteinen ist eine differentielle Markierung der verschiedenen Protein-Proben vor der quantitativen Analyse. Die Markierungen bewirken ein unterschiedliches Verhalten der Proteinfragmente im Massenspektrometer, welches eine relative Quantifizierung anhand der verschiedenen Signalintensitäten ermöglicht. Eines der ersten kommerziell erhältlichen Reagenzien zur quantitativen massenspektrometrischen Analyse von Proteinen ist ICAT™ (Isotope Coded Affinity Tag, Applied Biosystems). Nach dem Verdau der Protein-Proben bindet das ICAT™-Reagenz an die Aminosäure Cystein. So markierte Peptide werden durch Affinitäts-Chromatographie angereichert und massenspektrometrisch analysiert. Die verschiedenen ICAT™-Reagenzien unterscheiden sich in der Isotopen-Zusammensetzung des Elementes Kohlenstoff und damit in der Masse, so dass differentiell markierte Peptidspezies aus verschiedenen Proben sich in ihrer Gesamtmasse unterscheiden. Dieser Unterschied ist massenspektrometrisch detektierbar, wobei die verschiedenen Signalintensitäten zur relativen Quantifizierung herangezogen werden können. ICAT™ markiert ausschließlich Cystein-haltige Peptide. Cystein ist jedoch eine relativ seltene Aminosäure, was zwar nach einer spezifischen Anreicherung markierter Peptide zu einer Reduktion der Komplexität führt, jedoch zum anderen bewirkt, dass nur wenige Peptide pro Protein identifiziert werden können. Eine zu ICAT™ vergleichbare Methode ist MCAT (Mass Coded Abundance Tag, Cagney et al., 2002). Hier werden nach tryptischen Verdau einer Proteinprobe die C-terminalen Lysine jedes Peptides

mit ortho-methyl-Isoharnstoff zu Homoarginin derivatisiert. Die Vergleichsprobe bleibt unbehandelt. Über den durch die Derivatisierung eingeführten Massenunterschied und verschiedene Signalintensitäten lässt sich nun analog zu ICAT™ eine Quantifizierung durchführen. Der Nachteil von MCAT ist eine Verschiebung der Retentionszeit des markierten Peptides im Vergleich zum nicht-markierten Peptid bei der chromatographischen Auftrennung der Probe. Da die Ionisierungsbedingungen im Massenspektrometer zu verschiedenen Elutionszeitpunkten variieren können, sind die Signalintensitäten nur bedingt vergleichbar. Weiterhin hat die Markierung selbst einen Einfluss auf das Ionisierungsverhalten und damit die Signalintensität der markierten Peptidspezies. Der entscheidende Nachteil von MCAT ist jedoch die Erhöhung der Komplexität der Probe um den Faktor 2, da von jedem Peptid gleicher Aminosäuresequenz eine unmarkierte und eine markierte Form im Analyten enthalten sind.

Im Gegensatz zur chemischen Markierung nutzt eine von Ong et al. (2002) publizierte Methode den metabolischen Einbau einer markierten Aminosäure in das gesamte Proteom einer Zell- oder Bakterienkultur („Stable Isotope Labelling with Amino acids in Cell culture“, SILAC). Dabei wird ein Medium verwendet, welchem eine essentielle Aminosäure fehlt. Diese Aminosäure wird dem Medium zugegeben. Allerdings sind bei dieser Aminosäure mehrere Atome durch ein stabiles Isotop ausgetauscht (z.B. Lysin oder Arginin mit 6 ^{13}C -Atomen). Um einen nahezu vollständigen Einbau der markierten Aminosäure zu gewährleisten sind mehrere Zellgenerationen notwendig. Zur Quantifizierung werden nun das markierte und das unmarkierte Proteom vereinigt und massenspektrometrisch analysiert. Die quantitative Analyse erfolgt analog zu ICAT™ und MCAT, wobei die Nachteile im wesentlichen erhalten bleiben. SILAC erlaubt es, mehr als zwei Zustände in einer Analyse zu vergleichen, allerdings erhöht sich dadurch auch die Komplexität der Probe (Abb. 1.15). Ein Vorzug von SILAC ist, dass nicht nachträglich eine chemische Markierung in das Peptid eingeführt werden muss. Allerdings ist deshalb auch nur die Markierung von Zellkulturen und Bakterienkulturen möglich, so dass Primär-Proben nicht quantitativ mit SILAC analysiert werden können. Unpublizierte Versuche, SILAC in Mäusen anzuwenden scheinen erfolgreich zu sein, auch wenn ein nahezu vollständiger Austausch der normalen Aminosäure gegen die markierte erst nach der zweiten Filialgeneration zu beobachten ist.

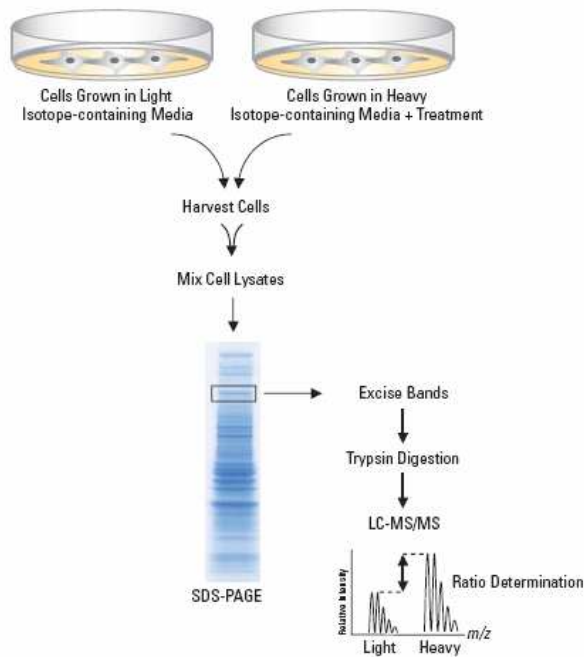


Abb. 1.15 Schematische Darstellung von „SILAC“ zur Quantifizierung von Proteinen

Durch SILAC („Stable Isotope Labelling with Amino acids in Cell culture“) lassen sich Proteine massenspektrometrisch quantifizieren. Eine Aminosäure wird im Medium durch eine markierte Aminosäure ersetzt und im Proteom der Zellen eingebaut. Die markierten Proteine werden mit nicht markierten vereinigt. Durch die Verwendung schwerer Isotope in der markierten Aminosäure haben alle Proteine eine höhere Masse als nicht-markierte. Die Detektion erfolgt im Massenspektrometer (Quelle: Cultek, 2007).

iTRAQ™ wurde ebenfalls von Applied Biosystems entwickelt und wird kommerziell vertrieben. Da in dieser Arbeit iTRAQ™ angewendet wurde und sich ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit mit der methodischen und statistischen Validierung von iTRAQ™-Daten beschäftigt, wird im folgenden Kapitel näher auf iTRAQ™ eingegangen.

1.3.2 iTRAQ™

iTRAQ™ („Isotope Tags for Relative and Absolute Quantification“) ist eine Methode für die auf Massenspektrometrie basierende Quantifizierung von Proteinen bzw. Peptiden (Ross et al., 2004). Wie die in 1.3.1 beschriebenen Quantifizierungsmethoden beruht iTRAQ™ auf einer differentiellen chemischen Markierung der zu quantifizierenden Peptide. Die Besonderheit von iTRAQ™ ist, dass alle iTRAQ™-Reagenzien chemisch identisch sind und isobare Eigenschaften haben. Das heißt, dass sie sich nicht in der Masse, Struktur oder chromatographischen Eigenschaften unterscheiden. Strukturell bestehen iTRAQ™-Reagenzien aus einer amino-reaktiven Gruppe, einer Reporter-Gruppe, welche das massenspektrometrische Signal für die Quantifizierung liefert und einer „Balancer“-Gruppe. Die Isotopen-Verteilung in der Reporter- und „Balancer“-Gruppe ist in jedem der vier momentan erhältlichen iTRAQ™-Reagenzien verschieden, jedoch wurden

die Isotope so gewählt, dass die Gesamtmasse der verschiedenen Markierungen mit 145 Da (Reporter + „Balancer“) identisch ist (Abb. 1.16). Es sind iTRAQ™-Reagenzien mit den Reporter-Massen 114, 115, 116 und 117 Da erhältlich. Die „Balancer“-Massen ergeben sich damit zu 31, 30, 29 und 28 Da. Eine Erweiterung der Anzahl der iTRAQ™-Reagenzien um vier weitere Reagenzien wurde von Pierce et al. (2007) veröffentlicht, ist jedoch zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht kommerziell verfügbar.

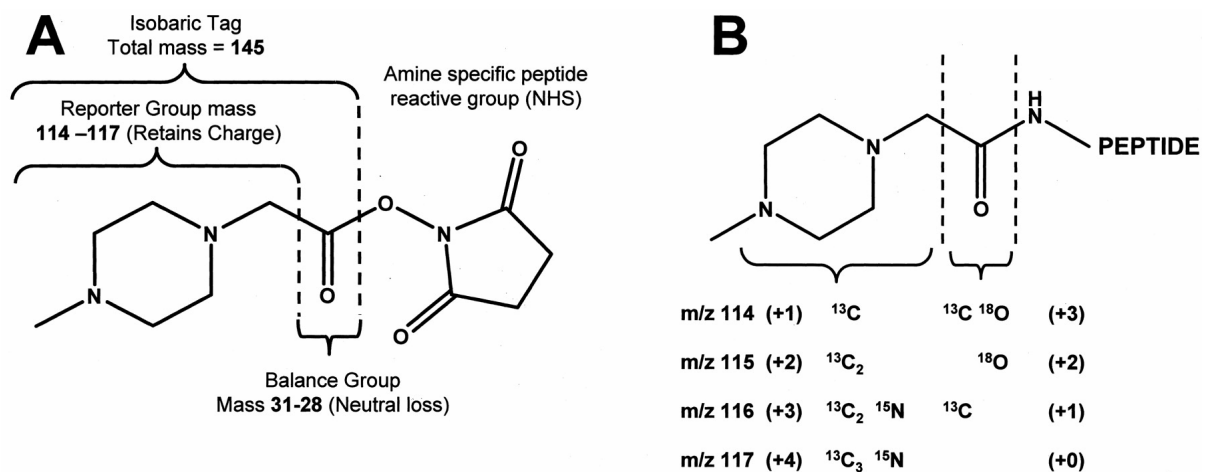


Abb. 1.16 Aufbau der iTRAQ™-Moleküle A) Das iTRAQ™-Molekül lässt sich in drei Bereiche gliedern. Die NHS-Gruppe reagiert spezifisch mit primären Aminogruppen wie sie in Lysin-Resten und jedem Amino-Terminus eines Peptides vorkommen. Die „Balancer“-Gruppe wird unter MS/MS-Bedingungen abgespalten, aber nicht detektiert, da sie keine Ladung trägt, während das Signal der Reporter-Gruppe zur relativen Quantifizierung genutzt werden kann. B) Die Isotopenverteilungen in den vier verschiedenen Reporter- und „Balancer“-Gruppen erzeugt in der Summe für jedes iTRAQ™-Reagenz eine Masse von 145 Dalton (Quelle: Ross et al., MCP 2004).

Sollen zwei verschiedene Proben massenspektrometrisch relativ zueinander quantifiziert werden, werden sie beide mit verschiedenen iTRAQ™-Reagenzien markiert. Anschließend werden beide Proben vereinigt und analysiert. Da beide Markierungen isobar sind, verhalten sich differentiell markierte Peptide gleicher Aminosäuresequenz identisch, das heißt sie haben dieselbe Masse und dieselben chromatographischen Eigenschaften. Die Komplexität der Probe bleibt damit unverändert. Wenn eine Peptidspezies für ein Fragmentierungs-Experiment im Massenspektrometer ausgewählt wird, zerfällt nicht nur die Aminosäure-Kette, sondern auch das iTRAQ™-Molekül in Reporter- und Balancer-Gruppe. Im Fragmentierungsspektrum lassen sich die einfach geladenen Reporter bei ihrer

spezifischen Masse detektieren. Das Intensitätsverhältnis der Reporter-Signale relativ zueinander entspricht nun dem Häufigkeitsverhältnis des analysierten Peptides in der ursprünglichen Probe (Abb. 1.17). Somit lässt sich in einem Fragmentierungsexperiment nicht nur die Aminosäure-Sequenz des Peptides bestimmen, sondern auch eine relative Quantifizierung durchführen. Ist die absolute Molekülzahl in einer der Proben bekannt, kann iTRAQ™ auch für eine absolute Quantifizierung eingesetzt werden.

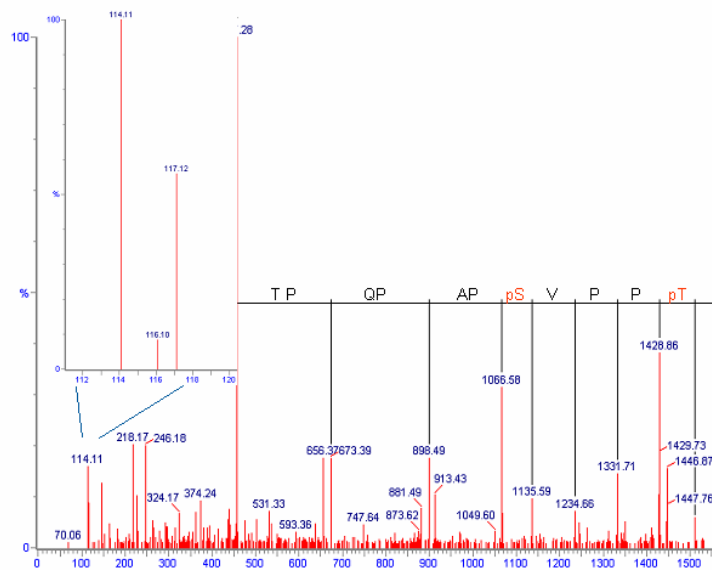


Abb. 1.17 Proteinquantifizierung durch iTRAQ™ Die Markierung von Peptiden mit iTRAQ™ ermöglicht eine Quantifizierung von Peptiden mit den Methoden der Massenspektrometrie. Die Peptidsequenz kann anhand der Peptidfragmente abgelesen werden. Das Intensitäts-Verhältnis der iTRAQ™-Reporter ermöglicht eine relative Quantifizierung des Peptids. Die Detektion von Phosphorylierungen ist durch iTRAQ™ nicht beeinträchtigt (Quelle: Fischer, 2004).

Die Identifizierung und Quantifizierung im gleichen Massenspektrum erhöht den analytischen Aufwand nicht. Weiterhin verändert die Markierung mit iTRAQ™ nicht die Komplexität der Probe und hat keinen differentiellen Einfluss auf die chromatographischen Eigenschaften des Analyten. Klare Vorteile von iTRAQ™ sind die Möglichkeit, auch klinische Proben zu markieren und somit quantitative Analysen abseits von Bakterien- und Zellkultur durchzuführen. Ein weiterer entscheidender Vorteil von iTRAQ™ ist, dass eine geringere Menge der Ausgangsmaterialien zur Analyse notwendig ist, da sich die absolute Anzahl jedes für ein Fragmentierungsexperiment ausgewählten Peptides erhöht und unter Umständen erst so für eine Identifizierung ausreicht. Allerdings überwiegt besonders bei der Untersuchung von Signal-Transduktionsereignissen die Anzahl nicht regulierter Proteine. Solche Proteine mit hoher Abundanz werden wegen ihrer stärkeren MS-Signale bevorzugt automatisch für ein Fragmentierungsexperiment ausgewählt und identifiziert bzw. quantifiziert.

Wie bei allen vergleichenden Analysen ist eine statistische Grundlage für die Ermittlung von Regulationsfaktoren mit iTRAQ™ notwendig, um signifikante Regulationen zu erkennen. Gerade in der Massenspektrometrie sind Signalintensitäten nicht immer mit Abundanz gleichzusetzen, sondern können vielmehr auf den physikalisch-chemischen Eigenschaften des Analyten beruhen. Der Zusammenhang zwischen Signalintensität und Signifikanz eines Regulationsfaktors ist bisher uncharakterisiert. Erschwert wird die Auswertung von iTRAQ™-Spektren durch Geräte-spezifische Limitationen. Bei der chromatographischen Auftrennung der zu analysierenden Peptide kann es zur Koelution von Peptiden verschiedener Sequenz aber annähernd gleicher Masse kommen. Wird dieser Massenbereich für ein Fragmentierungsexperiment ausgewählt, werden beide Peptid-Spezies fragmentiert und im gleichen MS/MS-Spektrum dargestellt. Man erhält also überlagerte Spektren mit ebenfalls überlagerten iTRAQ™-Reporterionen in einem nicht eindeutig identifizierbaren Spektrum. Eine weitere Limitation ist, dass bei der Ionisierung der Peptide nie gleiche Bedingungen vorliegen und Spektren sehr unterschiedlicher Qualität entstehen können. Andere Effekte wie der limitierte dynamische Bereich des Massendetektors und die Qualität der Signalverstärkung wirken sich direkt auf die Intensität der Reporterionen aus. Zusammengefasst produzieren diese Faktoren ein chemisches und technisches Rauschen, welches in die Analyse von mit iTRAQ™-generierten Daten einbezogen werden muss.

2. Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit zum Thema „Charakterisierung der durch Internalin A vermittelten Signaltransduktion in Epithelzellen“ soll die zelluläre Antwort von putativen Wirtszellen des humanpathogenen Bakterium *Listeria monocytogenes* auf den bakteriellen Virulenzfaktor Internalin A charakterisiert werden. *Listeria* induziert die Aufnahme in nicht professionell-phagozytierende Zellen durch die Interaktionen verschiedener Virulenzfaktoren mit Rezeptor-Proteinen auf der Zelle. Während der Endozytose-einleitende Prozess, der durch das bakterielle Protein Internalin B eingeleitet wird, bereits in der Grundzügen bekannt und verstanden wird, ist über die Vorgänge in der Zelle, welche durch die Bindung von Internalin A an E-cadherin eingeleitet werden, nur wenig bekannt. Dabei ist die Internalin A-abhängige, initiale Überwindung des Darmepithels der entscheidende Schritt bei einer Infektion durch *Listeria*. Die zellulären Prozesse, welche durch den Modell-Organismus *Listeria monocytogenes* ausgelöst werden, sollen Einblicke in generelle Mechanismen der Signaltransduktion und der Endozytose ermöglichen. Neben der Relevanz des Themas im Zusammenhang der Wirt-Pathogen-Interaktionen ist die Einleitung der Endozytose von E-cadherin auch bei der Entstehung und Verbreitung von Tumoren von Interesse. Die Suche nach solchen Proteinen und Mechanismen, welche auf der Seite des Wirtsorganismus zur Invasivität von *Listeria monocytogenes* beitragen, soll es ermöglichen ein detailliertes Modell für die Endozytose von *Listeria* zu erstellen.

Neben etablierten Methoden zur Analyse von Signaltransduktionsprozessen sollen neue Ansätze zu einer systematischen Betrachtung der Vorgänge, welche nach der Bindung des Virulenzfaktors Internalin A an sein zelluläres Zielprotein E-cadherin stattfinden, erdacht und etabliert werden. Dabei wird besonders auf die Phosphorylierung von Proteinen und die Aktivierung von Kinasen und Signalwegen fokussiert. Die Anwendung von iTRAQ™ zur massenspektrometrischen Quantifizierung von Proteinen muss für diese Fragestellung validiert werden, so dass eine statistisch fundierte Auswertung von quantitativen Daten ermöglicht wird. Die umfassende biochemische Charakterisierung von iTRAQ™ soll eine Datengrundlage zur statistischen Analyse von iTRAQ™-Daten schaffen, so dass posttranslational modifizierte Peptide in Relation zum Mutterprotein differentiell quantifiziert werden können.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Materialien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich, Fluka, Amersham, Applied Biosystems, Calbiochem, GibcoBRL, Merck, Millipore, Riedel deHaën, Roche und Roth bezogen. Wässrige Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser, welches mittels des MilliQ-Systems von Millipore gefiltert wurde, angesetzt.

3.1.1 Puffer

PBS (phosphate buffered saline, pH 7,2)

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	1,77 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
ad 1 L mit MilliQ Wasser	

TBS (Tris buffered saline, pH 7,5)

Tris base	6 g
NaCl	11,7 g
ad 1 L mit MilliQ Wasser	

TBS-T

Tween 20	1 ml
ad 1 L mit TBS	

TBS-T-NaCl

NaCl	29,22 g
ad 1 L mit TBS-T	

TBS-T-X

Triton X 100 5 ml
ad 1 L mit TBS-T

3.2 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

3.2.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1 Verwendete Bakterienstämme

Organismus	Geno-/Phänotyp	Referenz/Herkunft
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) CodonPlus™ RIL	F- ompT hsdS(rB-mB-) dcm+ Tetr galλ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr]	Stratagene, Amsterdam
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD Serotyp 1/2a	<i>Listeria monocytogenes</i> wildtyp	Leimeister-Wächter et al., 1989
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD $\Delta inlB2$	<i>inlB</i> -Deletion	Domann et al., 1992
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD $\Delta inlA2$	<i>inlA</i> -Deletion	Domann et al., 1992

3.2.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.2 Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz/Herkunft
pGEX-inlA496	inlA-Fragment aus <i>L. monocytogenes</i> in pGEX-6P-1	Schubert et al., 2001
pGEX-hEC1	N-terminale E-cadherin-Domäne aus <i>Homo sapiens</i> in pGEX-6P-1	Schubert et al., 2001
pGEX-inlA496-wt-StrepII	inlA-Fragment aus <i>L. monocytogenes</i> in pGEX-6P-1, Strep-Tag II am C-Terminus	Muschal, 2006
pGEX-inlA496-S192N, Y369S- StrepII	inlA-Fragment aus <i>L. monocytogenes</i> in pGEX-6P-1, S192N, Y369S, Strep-Tag II am C-Terminus	Wollert et al., 2007 Muschal, 2006

3.2.3 Kultumедien und Antibiotika

Medien für die Bakterienkultur wurden bei 121°C für 30 min durch Autoklavieren sterilisiert. Hitzeempfindliche Zusätze wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm) und zum erkalteten Medium gegeben.

BHI-Medium

37 g Brain-Heart-Infusion wurden in einem Liter Wasser gelöst und filtriert (10 kDa Ausschlußvolumen).

LB-Medium

10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt und 120 mM NaCl wurden in einem Liter Wasser gelöst und autoklaviert.

SOC-Medium

Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,584 g
KCl	0,18 g
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

Agarplatten

16 g Bacto-Agar wurden in einem Liter Medium gelöst und autoklaviert.

Tabelle 3.3 Verwendete Antibiotikazusätze

Antibiotikum	Stammlösung	<i>E. coli</i>
Ampicillin	100 mg/ml in bidest. H ₂ O	100 mg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in EtOH	34 mg/ml

Die Stammlösungen wurden bei –20°C bzw. 4°C gelagert und in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

3.2.4 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Überexpression der verschiedenen InIA-Konstrukte (Tabelle 2.2) wurde 0,125 µg Plasmid zu 100 µl auf Eis aufgetaute *E. coli* BL21 Codon Plus Zellen gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein 40-sekündiger Hitzeschock bei 42°C zur Verbesserung der Aufnahme des Plasmids in die Zelle. Anschließend wurden die Zellen für eine Minute auf Eis inkubiert und 220 µl SOC Medium zugegeben. Zur Expression der Resistenzgene wurden die Bakterien für 3 Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend auf Selektionsagar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.5 Kultivierung von *Listeria*

Zur Anzucht von *Listeria* wurde eine Einzelkolonie mittels einer sterilen Impföse von einer BHI-Agarplatte entnommen und in 10ml BHI-Medium suspendiert und über Nacht bei 180 rpm und 37°C inkubiert.

3.3 Zellbiologische Arbeiten

3.3.1 Zelllinien

Tabelle 3.4 In der Arbeit benutzte Zelllinien

Zelllinie	aus	Herkunft/Referenz
MCF7	Humane Adenokarzinom-Epithelzellen (Brust)	DSMZ: ACC115
Caco-2	Humane Adenokarzinom-Epithelzellen (Dickdarm)	ATCC: HTB-37
HeLa-S3	Humane Adenokarzinom-Epithelzellen (Gebärmutterhals)	Medizinische Hochschule Hannover; ATCC: CCL-2.2

3.3.2 Medien und Zusätze

Standard-Medium

Zu Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 1000 mg/L Glucose und 110 mg/L Na-Pyruvat (Gibco BRL) wurden 10% FCS, 2 mM L-Glutamin (Flow Laboratories) und je 50 U/ml Penicillin/Streptomycin (P/S) zugefügt.

Induktionsmedium

Zu Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 1000 mg/L Glucose und 110 mg/L Na-Pyruvat (Gibco BRL) wurden keine Zusätze zugefügt. Zur Stimulation wurde eine InIA-Konzentration von 8,5 nM eingestellt.

3.3.3 Stickstoffeinlagerung und Kulturbedingungen

Zur Stickstoffeinlagerung wurden Zellen in 175 cm² Zellkulturflaschen (Nunc) bis zu einer Konfluenz von 70% kultiviert und mittels Trypsin abgelöst. Nach einer Zentrifugation bei 300 x g für 3 Minuten wurden die Zellen in Standard-Medium ohne P/S resuspendiert, ausgezählt und eine Zellkonzentration von 4×10^6 / ml eingestellt. Zu den auf 5°C abgekühlten Zellen wurde eine kalte Lösung aus Standard-Medium ohne P/S und 20% DMSO tropfenweise zugegeben und Aliquots von 1 ml (2×10^6 Zellen / ml) in Kryoröhrchen (Nunc) für 24 Stunden bei -70°C im Isopropanol-Bad eingefroren. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur erneuten Kultivierung wurde ein Röhrchen bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut und die Zellen in 9 ml Standard-Medium überführt. Nach einer Zentrifugation (300 x g, 3 min) wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 8 ml Standard-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine 10 cm Zellkulturschale (Nunc) bei 37°C und 7,5% CO₂ (v/v) in einem Brutschrank (New Brunswick) kultiviert.

3.3.4 Passagieren von Zellen

Bei Erreichen einer Zellkonfluenz von 80% wurden die Zellen mit 8 ml PBS gewaschen und 2 ml Trypsinlösung zupipettiert. Die enzymatische Zerstörung der

Zell-Matrixverbindungen führte nach 3 min bei 37°C zu einem Ablösen und Abrunden der Zellen von der Kulturschalenoberfläche. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 8 ml Standard-Medium inaktiviert und die Zellsuspension zentrifugiert (300 x g, 3 min). Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in Standard-Medium resuspendiert, die gewünschte Zellzahl eingestellt und zur weiteren Kultivierung in unbenutzte Kulturschalen überführt.

3.3.5 Induktionsexperimente

Für Induktionsexperimente wurden Zellen in einer 10cm Zellkulturschale (Nunc) bis zu einer Konfluenz von 70% kultiviert. Aus der hohen Konfluenz resultierte eine hohe Zahl von Zell-Zell-Kontakten. 24 Stunden vor einem Induktionsexperiment wurden die Zellen mit 8 ml PBS gewaschen und die Zellen in DMEM (1000 mg/L Glucose) ohne Zusätze weiterkultiviert. Zwei Stunden vor Induktion wurde erneut mit PBS gewaschen und das Medium erneuert. Zur Stimulation wurde das Medium abgesaugt und 6 ml Induktionsmedium (10 cm Schale) zugegeben. Anschließend wurden die Zellen für ausgewählte Zeiträume bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Vor der Zelllyse wurde das Induktionsmedium abgesaugt und 500 µl Lysispuffer zugegeben. Während einer dreiminütigen Inkubation auf Eis lösten sich die Zellen und ließen sich anschließend in ein Eppendorf-Gefäß überführen. Zur vollständigen Lyse wurde die Suspension für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde durch eine Zentrifugation mit 16000 x g bei 4°C geklärt und das Pellet verworfen. Im Falle einer späteren Verwendung wurde das Lysat bei -70°C gelagert.

3.3.6 RNA-Interferenz

Für die transiente Deregulation des Proteins Hakai wurden 90000 Zellen in ein Loch einer 6-fach-Kulturschale (Nunc) in Standard-Medium ausgesät. Nach 30 Stunden wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und 2 ml DMEM ohne Zusätze zugegeben. Es wurden von vier siRNAs (HS_CBLL1_1 - 4, Qiagen, 2 µM) jeweils 1,5 µl zu 100 µl DMEM ohne Zusätze gegeben. Anschließend wurden 12 µl des Transfektionsreagenzes (HiPerfect, Qiagen) zugegeben und der Ansatz für 10 min

zur Bildung der Transfektionskomplexe bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben und durch leichtes Schwenken verteilt. Nach zehn Stunden wurde 220µl FCS zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden neun Stunden später mit 1 ml PBS gewaschen und erneut siRNA wie oben, allerdings unter Verwendung von Standard-Medium zugegeben. 24 Stunden später wurden die Zellen mit 2x1 ml PBS gewaschen und siRNA unter Verwendung von DMEM ohne Zusätze zugegeben. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen für weitere Experimente verwendet. Die Effizienz der reduzierten Expression des Zielproteins wurde mittels immunologischer Detektion (Western Blot) ermittelt.

3.3.7 Inhibition der proteasomalen Proteindegradation

Die zelluläre Proteindegradation im Proteasom und Lysosom wurde durch die Verwendung der Zell-permeablen Chemikalie MG-132 (Merck) inhibiert. Dazu wurde eine 5mM Lösung MG-132 in DMSO hergestellt und Zellen für 5 Stunden mit 5 µM MG132 DMEM ohne Zusätze inkubiert, bevor sie für weitere Experimente verwendet wurden. Die Effizienz der Inhibition wurde mittels immunologischer Detektion (Western Blot) ubiquitinierten Proteine ermittelt.

3.3.8 Nachweis der Endocytose von E-cadherin nach InA-Stimulation („Trypsin Protection Assay“)

Zum Nachweis der Endocytose von E-cadherin nach der Stimulation von Caco-2 Zellen (90% Konfluenz, 175 cm²-Zellkulturflasche) durch Internalin A (15 ml 8,5 nM Internalin A in DMEM ohne Zusätze) wurden Zellen nach 3.3.5 für 5 Minuten stimuliert. Nach der Stimulation wurde das Induktionsmedium entfernt und mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 5 ml Trypsin zugegeben und der Verdau nach 3 Minuten durch Zugabe von 10 ml Standard-Medium abgestoppt. Die Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß (Falcon, 50 ml) überführt und für 3 Minuten bei 950 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und

nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur 15 µl 10% Trifluoressigsäure zugegeben. Anschließend wurde eine Proteinextraktion nach 3.4.1 durchgeführt und das Präzipitat in 200 µl Quellschlösung resuspendiert.

Das Zell-Präzipitat wurde in 1 ml Lysispuffer ausgenommen und für 60 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 13000 rpm bei 4°C für 20 Minuten wurde eine Proteinbestimmung nach 3.4.2 durchgeführt und je 20 µg Protein auf ein eindimensionales SDS-Gel (12% Acrylamid) nach 3.4.3 aufgetragen. E-cadherin wurde nach 3.4.5 detektiert.

3.3.9 *In vitro* Infektionsexperimente (“Gentamicin Protection Assay”)

Für Infektionsexperimente wurden nach 3.3.6 und 3.3.7 behandelte Zellen sowie unbehandelte MCF-7 Zellen verwendet. Am Tag vor der Infektion wurden Vorkulturen von *Listeria monocytogenes* wildtyp, Δ InlA und Δ InlB angesetzt (siehe 3.2.5). Am Tag der Infektion wurden 50 ml BHI-Medium mit 1 ml Vorkultur beimpft und bei 180 rpm und 37°C inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8 wurden die Bakterien zentrifugiert (3000 x g, 15 min), in 50 ml DMEM ohne Zusätze resuspendiert und auf Eis aufbewahrt. Zur Ermittlung der Anzahl der zu infizierenden Zellen wurde ein Loch mit 1 ml PBS gewaschen und 200 µl Trypsin-Lösung zugegeben. Nach 3 min wurde der Verdau durch Zugabe von 800 µl Standard-Medium abgestoppt und die Zellen mittels Neubauer-Kammer unter dem Mikroskop gezählt. Das Auszählen wurde für nach 3.3.6 transfizierte und nach 3.3.7 behandelte Zellen wiederholt. Die Infektion wurde mit 30 Bakterien / Zelle durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS/Mg/Ca gewaschen und bereits in 2 ml DMEM ohne Zusätze suspendierte Bakterien zugegeben. Anschließend wurden die Zellen für 4 min bei 1000 x g zentrifugiert und für 30 min im Brutschrank inkubiert. Das Infektionsmedium wurde abgesaugt und zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Extrazelluläre Bakterien wurden durch Zugabe des Antibiotikums Gentamicin in DMEM (50 µg/ml) für 30 min im Brutschrank abgetötet. Anschließend wurden die Zellen sechsmal mit 1 ml PBS gewaschen 1 ml steriles 0,2% Triton X100 zugegeben. Nach einer Inkubation von 3 min auf Eis lösten sich die Zellen ab und wurden in ein Eppendorfgefäß transferiert. Zur Lyse der Zellen wurden sie für 60 min auf Eis inkubiert. Es wurde eine

Verdünnungsreihe hergestellt (1:10, 1:100, 1:1000) und von jeder Verdünnung je 100 µl auf drei BHI Agar-Platten (10 cm) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien ausgezählt. Als Referenz für die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten (CFUs) wurde die Anzahl Kolonien von *Listeria monocytogenes* in unbehandelten Zellen verwendet und gleich 100% gesetzt.

3.4 Biochemische Arbeiten

3.4.1 Präzipitation von Proteinen nach Wessel-Flügge (1984)

Eine Proteinfällung wurde zur Aufreinigung und Konzentration von Proteingemischen durchgeführt. Zu einer Proteinlösung wurden 4 Vol Methanol gegeben und geschüttelt. Nach der Zugabe von 1 Vol Chloroform und 3 Vol Wasser wurde erneut geschüttelt und bei maximaler Einstellung zentrifugiert. Präzipitiertes Protein sammelt sich in der Interphase. Die obere wässrige Phase wurde verworfen. Falls das Präzipitat nicht entnommen werden konnte, wurden 3 Vol Methanol zugegeben und so die Phasengrenze gebrochen. Zum Pelletieren wurde erneut zentrifugiert.

3.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes wurde in einer Mikrotiterplatte 10 µl Probe mit 200 µl Coomassie Brilliantblau G 250 (1 : 5 verdünnt, Biorad) (Bradford 1976) vermischt und die Extinktion mittels des Tecan Elisa-Vollautomaten gemessen. Für jede Probe wurde eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt. Der Proteingehalt wurde anhand einer ebenfalls aufgezeichneten Kalibrierung mit Käberserum-Albumin (BSA) interpoliert.

3.4.3 Denaturierende Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Trennung komplexer Proteingemische nach der Größe ihrer Komponenten wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli et al., 1970) angewandt. Aufzutrennende Proben wurden in 4x SDS-Probenpuffer (4% SDS; 4% Glyzerin, 0,4% EtSH, 0,1% Bromphenolblau, 30 mM Tris-HCl, pH 6,8) aufgenommen. Die Elektrophorese wurde im Minigel-System von Biometra (85 x 65 x 0,5 mm) durchgeführt. Als Molekulargewichtsreferenz wurden 5-10 µl „Prestained Protein Ladder 10-180 kDa“ (Fermentas) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer (3 g/l Tris-Base, 14,4 g/l Glycin, 1% SDS) für 25 min bei 120 V. Nach Durchlaufen des Sammelgels wurde die Spannung für 50 min auf 180 V erhöht.

Trenngel (Angaben jeweils für 2 Mini-Gele):

	10%	12%
Bidest. H ₂ O	6,1 ml	5,1 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	3,8 ml	3,8 ml
Acrylamid/Bis (37,5:1)	5 ml	6 ml
10% SDS	150 µl	150 µl
TEMED	20 µl	20 µl
10% APS	20 µl	20 µl

Sammelgel (Angaben jeweils für 2 Mini-Gele):

Bidest. H ₂ O	6,1 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml
Acrylamid/Bis (37,5:1)	1,5 ml
10% SDS	100 µl
TEMED	50 µl
10% APS	20 µl

3.4.4 Protein-Färbemethoden

Je nach Zielsetzung des Experimentes wurde verschiedene Methoden zur Visualisierung von Proteinen nach der Gelelektrophorese angewendet

Coomassie-Färbung nach Neuhoff (modifiziert)

Die Coomassie-Färbung wurde nach einem modifiziertem Protokoll (Candiano et al., 2004) durchgeführt. Dazu wurde das Gel direkt nach der Elektrophorese in Coomassie Färbelösung (100 g $\text{N}_2\text{H}_8\text{SO}_4$, 100 ml H_3PO_4 , 700 ml H_2O , 1,2 g Coomassie BB-G-250, 200 ml CH_3OH) gelegt und über Nacht unter schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Entfärben wurde das Gel mehrmals für eine Stunde mit Wasser geschwenkt.

RuBPS-Färbung

Die Färbung mit dem Farbstoff RuBPS (Ruthenium II tris / bathophenanthrolin disulfonat) dient dem Nachweis von Proteinen im Gel mittels Fluoreszenz. Die Sensitivität der Färbung ist mit der Silberfärbung vergleichbar. Das Gel wurde nach der Elektrophorese drei Stunden oder über Nacht fixiert (30% Ethanol, 10% Essigsäure) und 4 x15 min in 20% Ethanol zur Entfernung von Säure- und SDS-Resten gewaschen. 15 μl der nach Rabilloud et al. (2001) hergestellten Stammlösung wurden in 1 L 20% Ethanol suspendiert und das Gel darin über Nacht unter Lichtausschluss geschwenkt. Die Entfärbung wurde mit Fixierlösung durchgeführt und das Gel in 20% Ethanol umgepuffert. Die Detektion erfolgte an der Kamera Camilla 2 (Raytest, Camilla Software V1.01) unter der Verwendung des Emissionsfilters HQ605/20 und der Anregung mit blauem Licht (Dia blue).

ProQ-Färbung

Der Fluoreszenz-Farbstoff ProQ-Diamond bindet spezifisch an phosphorylierte Aminosäuren und kann zur Visualisierung von phosphorylierten Proteinen in Proteingelen verwendet werden (Martin et al., 2003). Die relative Intensität des Fluoreszenz-Signals entspricht dabei dem Grad der Phosphorylierung eines Proteins. Das Gel wurde nach der Elektrophorese drei Stunden oder über Nacht fixiert (30% Ethanol, 10% Essigsäure) und 4 x15 min in Wasser zur Entfernung von Säure- und SDS-Resten gewaschen und anschließend in der kommerziell erhältlichen ProQ-Diamond-Lösung (Molecular Probes) für drei Stunden unter Lichtabschluss geschwenkt. Das Gel wurde für 18 Stunden entfärbt (20% 1,2-Propandiol, 50 mM Na-Acetat, pH 4). Die Detektion erfolgte an der Kamera Camilla 2 (Raytest, Camilla Software V1.01) unter der Verwendung des Emissionsfilters HQ605/20 und der Anregung mit grünem Licht (Dia green).

3.4.5 Semi-dry Blot

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden die nach 2.4.3 aufgetrennten Proteingemische nach dem „Semi-dry Blot“-Verfahren (Khyse-Anderson, 1984) auf Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Membranen übertragen. Dazu wurde das Gel für 10 min in Blotpuffer (14,3 g/l Glycin, 3 g/l Tris-Base, 20% Methanol, 0,1% SDS, pH8,3) äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde für 1 min in Methanol aktiviert und 2 min in Blotpuffer äquilibriert. Gel und PVDF-Membran wurden zwischen 2 in Blotpuffer getränkte Bögen Whatman-Papier luftblasenfrei gelegt. Dieser Stapel wurde zwischen Anode und Kathode eines Semi-dry Blotters (Biorad) gelegt und eine Strom von $2\text{mA}/\text{cm}^2$ PVDF-Membran für 1 Stunde angelegt. Anschließend wurde das Gel nach 2.4.4 mit Coomassie gefärbt und die Membran für die immunologische Detektion von Proteinen weiterbehandelt (3.5.2).

3.4.6 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Während dieser Arbeit wurden ein InIA₄₉₆-GST-Konstrukt und ein hEC1-GST-Konstrukt (Tab. 2.2) überexprimiert und aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde entsprechend der Dissertation von M. Machner (Machner, 2002) durchgeführt.

3.4.7 Aufreinigung von Strep-Tag II-Fusionsproteinen

Während dieser Arbeit wurden zwei InIA₄₉₆-Strep-Tag II-Konstrukte (Tab. 2.2) überexprimiert und aufgereinigt. Die Aufreinigung wurden entsprechend der Diplomarbeit von S. Muschal (2006) durchgeführt.

3.4.8 Anreicherung von phosphorylierten Proteinen durch „Immobilized Metal Affinity Chromatography“ (IMAC)

Zur Anreicherung von phosphorylierten Proteinen wurde der kommerziell erhältliche Baukasten „Phosphoprotein Purification Kit“ von Qiagen (Cat. No. 37101) verwendet. Dazu wurden Zellen der Zelllinien MCF7 und Caco-2 in großen Kulturflaschen (175cm²) bis zu einer Konfluenz von 70% (MCF7) bzw. 50% (Caco-2) vermehrt und nach 3.3.5 für 5 Minuten mit Internalin A inkubiert. Anschließend wurde das Induktionsmedium entfernt. Die Zelllyse erfolgte mit dem im Baukasten enthaltenen Lyse-Puffer (5 ml). Anschließend wurde die Proteinkonzentration nach 3.4.2 bestimmt und eine Konzentration von 0,1 mg/ml in Lyse-Puffer hergestellt und auf die IMAC-Säulen aufgetragen. Das Säulenmaterial wurde mit 6ml des mitgelieferten Waschpuffers gewaschen und sechsmal mit 500 µl Elutionspuffer eluiert. Bei jeder Fraktion wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Zur Überprüfung des Funktionierens der Methode wurden je 20 µg Phosphoproteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Gel mit ProQ nach 3.4.4 gefärbt.

3.4.9 *In vitro* Kinase Assay

Zur Bestimmung der Src-Phosphorylierungsstelle im Peptid DNVYYYDEEGGGEEDQDFDLSQLHR wurde 3,67 nmol Peptid mit 34 nmol ATP in 200µl eines Reaktionspuffers aus 0,1M Hepes, 7,5mM MgCl₂, 7,5mM MnCl₂, 5mM DTT, 1mM NaVO₃, pH 7,5 nach Zugabe von 6µl rekombinanter c-Src Kinase (0,88µg, Biomol) für 80 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde zu einem Reaktionsvolumen von 18,1µl (entspricht 1µg Peptid) 5µl 5% Ameisensäure zugegeben und die Peptide nach 3.6.2 aufgereinigt und entsalzt. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte nach 3.6.4.

Zur *in vitro* Phosphorylierung von nativem E-cadherin wurden 100µl des oben genannten Puffers ohne DTT und NaVO₃ verwendet. E-cadherin wurde mit 10µg Antikörper (BD Transduction Labs) aus einem Zelllysats unstimulierter Caco-2 Zellen nach 3.5.3 präzipitiert. Zur Phosphorylierung wurden 10µl Src verwendet.

3.5 Immunologische Arbeiten

3.5.1 Antikörper

Aufgereinigte Antikörper wurden in 5% Magermilchpulver in TBS-T angesetzt. Folgende Antikörper wurden verwendet:

Tabelle 3.5 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Isotyp	Antigen	Verdünnung	Referenz
610182	monoklonal, Maus IgG	E-cadherin, intrazellulär	1 : 1000	BD Transduction
SC-7870, H108	polyklonal, Hase IgG	E-cadherin, extrazellulär	1 : 1000	Santa Cruz
EP700Y	monoklonal, Hase IgG	E-cadherin, extrazellulär	1 : 1000	Epitomics
610154	monoklonal, Maus IgG	β -catenin	1 : 2000	BD Transduction
C5615	monoklonal, Maus IgG	pS45 β -catenin	1 : 1000	Sigma
MMS-258R, P4G7	monoklonal Maus IgG	Ubiquitin, Polyubiquitin	1 : 1000	Covance
A5060	polyklonal, Hase IgG	Actin (AA20-33)	1 : 2000	Sigma
34680, Tag-100	monoklonal, Maus IgG	MAPK1	1 : 1000	Qiagen
ARP39623_T200	polyklonal, Hase IgG	CBLL1 Hakai	1 : 1000	Aviva

Tabelle 3.6 Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Spezifizierung
A4a	1 zu 2000	Ziege- <i>anti</i> -Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat (Dianova)
B4c	1 zu 2000	Ziege- <i>anti</i> -Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat (Dianova)

Zur Generierung eines phosphospezifischen E-cadherin Antikörpers an Y753 wurde ein synthetisches Peptid der Sequenz PPEDDTRDNVpYYYYDE zur Immunisierung von Hybridomazellen verwendet. Die Arbeiten wurden von Christian Erk (HZI Braunschweig, Zellbiologie) durchgeführt. Folgende Klone und Subklone wurden als Zellkulturüberstände getestet und eingesetzt:

Tabelle 3.7 Phosphospezifische (Y753) E-cadherin Antikörper

Antikörper	Typ	Interne Bezeichnung
c36	Klon	A
c61	Klon (IgM)	B
c62	Klon	C
61D11	Subklon (IgG)	B sub
62F12	Subklon	C sub

3.5.2 Immunodetektion und Chemolumineszenz

Die Detektion der nach 3.4.5 auf PVDF übertragenen Proteine erfolgte durch Antikörper (Tabelle 3.5). Dazu wurde die PVDF-Membran nach dem Blot für 60 min in Blockierlösung (5% Magermilchpulver in TBS-T) bei Raumtemperatur geschwenkt und einmal 10 min mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Folie eingeschweißt und der in 4 ml Blockierlösung verdünnte Antikörper zugegeben und über Nacht bei 4°C geschwenkt. Nicht gebundener Primärantikörper wurde durch 10-minütige Waschschrte mit TBS-T, TBS-T-NaCl, TBS-T-X und TBS-T entfernt. Darauf folgte eine 60-minütige Inkubation mit dem Peroxidase gekoppelten Sekundär-Antikörper in 4 ml Blockierlösung. Nach dreimaligen Waschen der Membran mit TBS-T erfolgte die Detektion mit dem CCD-Kamerasystem LAS3000 (Fuji) unter Zugabe eines Substrates für die Peroxidase (Lumi-Light, Roche oder ECL-Advance, Amersham). Dabei wird durch die Luminol-Reaktion Licht freigesetzt (Chemolumineszenz), welches durch die Kamera detektiert wird.

3.5.3 Immunpräzipitation von Proteinen

Zur immunologischen Präzipitation von Proteinen aus Zelllysaten wurden Protein G-gekoppelte magnetische Kügelchen (Dynabeads, Invitrogen) verwendet. Zur

Aktivierung wurden 30 µl der Dynabeads zweimal in 1 ml Aktivierungspuffer (Citrat-Puffer, pH 5,0) geschüttelt und die Kügelchen mit einem Magneten präzipitiert. Anschließend wurden die Kügelchen in einer Suspension aus 5 µg Antikörper in 100 µl Aktivierungslösung aufgenommen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur umgewälzt. Nach zweimaligen Waschen und äquilibrieren in 100 µl Lysispuffer, wurde Lysat zu den Kügelchen pipettiert und der Ansatz über Nacht bei 4°C umgewälzt. Anschließend wurden die Kügelchen dreimal mit 1 ml Lysispuffer gewaschen. Alternativ zu diesem Verfahren wurden 5 µg Antikörper zum Lysat gegeben und über Nacht bei 4°C umgewälzt. Anschließend wurden 30 µl aktivierte Kügelchen zugegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 ml Lysispuffer wurden die Kügelchen in 4-fach Probenpuffer aufgenommen und präzipitierte Proteine nach 3.4.3 gelelektrophoretisch aufgetrennt.

3.6 Massenspektrometrische Arbeiten

3.6.1 Probenvorbereitung nach Gelelektrophorese

Zur Identifizierung von Proteinen in Gelstücken wurde eine Gelbande nach Coomassie-Färbung ausgeschnitten und in Würfel mit einer Kantenlänge von etwa 1 mm zerteilt. Der Coomassie-Farbstoff wurde durch langsames Schütteln der Gelstücke in 1 ml Fixierer ausgewaschen und die Lösung verworfen. Die Gelstücke wurden mit 200 µl Acetonitril (ACN) dehydriert und mit 100 mM Amoniumhydrogencarbonat rehydriert. Beide Schritte wurden einmal wiederholt und die Gelstücke ein weiteres mal dehydriert und in einem Vakuumkonzentrator getrocknet. Zum Verdau der Proteine wurden die Gelstücke in Trypsinlösung (2 µg/ml, Sequencing Grade Trypsin, Promega) rehydriert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein Gelstück-Volumen Acetonitril zugegeben und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Gelstücke wurden in einem Volumen 5% Ameisensäure für 15 min bei 37°C geschüttelt. Nach Zugabe eines weiteren Volumens ACN und Schütteln bei 13°C wurden die Überstände mit den aus dem Gel herausgewaschenen Peptiden vereinigt und eingedampft.

3.6.2 Aufreinigen und Entsalzen von Peptiden

Für die massenspektrometrische Analyse wurden Peptidgemische aufgereinigt und entsalzt. Dazu wurden eingedampfte Peptide in einer Waschlösung (2% Methanol und 0,1% Trifluoressigsäure (TFA)) resuspendiert. Die Aufreinigung erfolgte mit Pipettenspitzen, welche mit C₁₈-Reversed-Phase-Material gepackt waren (ZipTip, Millipore). Vor Gebrauch wurde das Material durch Waschen mit Elutionslösung (65% Methanol, 0,1% TFA) aktiviert und durch dreimaliges Pipettieren mit Waschlösung äquilibriert. Die Bindung der Peptide an das C₁₈-Material erfolgte durch mehrmaliges, luftblasenfreies Pipettieren der Peptidlösung. Anschließend erfolgte der Waschschrift durch viermaliges Pipettieren von frischer Waschlösung. Die Peptide wurden durch einmaliges pipettieren mit Elutionslösung in ein neues Eppendorfgefäß eluiert. Zur Analyse wurden die Peptide eingetrocknet, in 12 µl 0,1% TFA resuspendiert und nach einer Zentrifugation bei 120000 xg für 20 min massenspektrometrisch analysiert.

3.6.3 Subfraktionierung von Peptiden durch Ionenaustausch-Chromatographie

Bei komplexen Proben wurde vor der Proteinidentifikation durch HPLC-MS eine Peptidfraktionierung durch Kationen-Austauschchromatographie durchgeführt. Dazu wurden die iTRAQ™-markierten Peptide eingedampft und in Puffer A (10 mM KH₂PO₄, 25% Acetonitril, pH<3) resuspendiert und für 10 Minuten bei 16000 x g zentrifugiert. Die Probe wurde in einem SMART HPLC-System von Pharmacia Biotech fraktioniert. Als Säule kam eine „Magic Bullet Micro“ (Alltech, Poly Sulfo Ethyl)-Kartusche mit einer Kapazität von 100µg und einem Durchmesser von 3µm zum Einsatz. Die Flussrate betrug 150µl/min. Die Elution wurde durch einen 30-minütigen Gradienten bis 60% Puffer B (10 mM KH₂PO₄, 1 M KCl, 25% Acetonitril, pH<3) durchgeführt. Es wurden Fraktionen zu je 150 µl gesammelt und nach 3.6.5 per LC-MS analysiert.

3.6.4 Proteinidentifikation durch ESI-Q-TOF MS

Proben für die massenspektrometrische Analyse durch Elektrospray-Ionisierung Quadrupol-Time-Of-Flight (ESI-Q-TOF) Massenspektrometrie wurden in 65% Methanol / 5% Ameisensäure suspendiert und in Gold/Palladium beschichtete Glasnadeln (Proxeon Biosystems) überführt. Die Analyse erfolgte an einem Q-TOF 2 Massenspektrometer (Micromass, Manchester UK). Die Kapillarspannung betrug 0,9 bis 1,3 kV, die TOF-Spannung 9,1 kV, die Reflectron-Spannung 35,35 kV und die Multichannelplate (MCP)-Spannung 2,3 kV. Als Kollisionsgas diente Argon.

3.6.5 Proteinidentifikation durch HPLC-MS

Komplexe Proteinproben wurden nach 3.4.1 präzipitiert und in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat aufgenommen. Anschließend wurde Trypsin (Promega) in einem Verhältnis 1 zu 50 – 1 zu 100 zum Protein zugegeben und der Ansatz über Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Peptide entsalzt (3.6.2) und in 12 µl 0,1 % TFA resuspendiert und bei 120000 xg zentrifugiert. 10 µl der Probe wurden mittels Umkehrphasen-Chromatographie PepMap (Hauptsäule: C18; Partikelgröße 100 Å; Ø 75 µm; Länge 15 cm); Vorsäule: C18; Partikelgröße 300Å; Ø 300 µm; Länge 5 mm) an einer Ultimate Nano HPLC-Anlage (LC-Packings / Dionex) durch einen Lösungsmittelgradienten (5%-60%B-Gradient mit A = 0,1% (v/v) Ameisensäure; B = 0,1% (v/v) Ameisensäure, 80% (v/v) Acetonitril) und eine Flussrate von 200 nl/min (Vorsäule 30µl/min) aufgetrennt. Je nach erwarteter Komplexität und Konzentration der Probe wurden lineare Gradientenlängen von 30 bis 120 Minuten gewählt. Zur massenspektrometrischen Analyse wurde ein Q-TOF micro (Micromass, Manchester UK) eingesetzt. Die Kapillarspannung betrug 0,9 bis 1,3 kV, die TOF-Spannung 9,1 kV, die Reflectron-Spannung 35,35 kV und die Multichannelplate (MCP)-Spannung 2,3 kV. Als Kollisionsgas diente Argon.

3.6.6 Proteinquantifizierung mit iTRAQ™

Zur Proteinquantifizierung mit massenspektrometrischen Methoden wurde das kommerziell bei Applied Biosystems erhältliche iTRAQ™ verwendet. Die Funktionsweise ist in 1.3.2 dargestellt. Zur Markierung von Peptiden mit iTRAQ™-Reagenzien dürfen keine primären Amine in der Probe enthalten sein, weshalb bei einem vorher nötigen Verdau von Proteinen im Verdaupuffer Ammoniumbicarbonat durch das quartäre Amin TEAB (Tetraethylammonium-borohydrid) ersetzt werden muss. Die Markierung von Peptiden erfolgt nach den Vorgaben des Herstellers, mit dem Unterschied, dass auf eine Reduktion und Alkylierung der Proteine verzichtet wurde. Dazu werden maximal 80 µg eines komplexen Proteingemisches durch Trypsin verdaut (maximales Volumen 35 µl). Anschließend wurde zu den iTRAQ™-Reagenzien 70 µl Ethanol zugegeben, gevortext und die Mischung zu den verdauten Proteinen gegeben. Darauf folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Bei Bedarf wurde die Vollständigkeit der Reaktion durch eine massenspektrometrische Analyse überprüft. Anschließend wurden die zu vergleichenden Proben vereinigt und analysiert.

3.6.7 Datenanalyse von Massenspektren

Die manuelle Datenanalyse von Massenspektren erfolge mit der Software MassLynx 4.0 von Micromass. Zur automatisierten Identifikation von Proteinen in den nach 3.6.4 generierten Massenspektren wurde das Programm Mascott (Matrix Science) verwendet. Dazu wurden die aufgezeichneten Rohdaten in Listen umgewandelt (2-fache Glättung über 7 Kanäle, Zentroidierung bei 80%) und diese Listen mit zur Probe passenden Datenbanken abgeglichen. Als Massengenauigkeit wurde 50-100 ppm eingestellt. Nur Peptide mit dem Rang 1 wurden als signifikant angesehen. Modifikationen wie Phosphorylierung an Serin, Threonin oder Tyrosin wurden variabel in die Suchparameter aufgenommen. Die iTRAQ™-Modifikation wurde bei entsprechend behandelten Proben als fix angenommen.

3.6.8 Identifikation von putative aktivierten Kinasen durch "Text-Mining"

Eine Liste der Proteine, welche nach 3.4.8 angereichert wurden und demnach als durch Internalin A-Stimulation phosphoryliert gelten, wurde mit dem kommerziell erhältlichen Computer-Programm Pathway Studio 5.0 (Ariadne Genomics) ausgewertet. Mit dem Programm läßt sich die Datenbank Resnet 5 (Ariadne Genomics) nach bekannten Interaktionen zwischen den eingegebenen Proteinen und einer anderen Protein-Klasse – in diesem Fall Kinasen – suchen und diese graphisch darstellen. Die Datenbank enthält die Mehrzahl aller bekannten Protein-Protein-Interaktionen und basiert zum Teil auf den in der Literaturdatenbank PubMed abgelegten Daten. Die systematische Analyse führt zu einer Liste von potentiell aktiven Kinasen.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur massenspektrometrischen Proteinquantifizierung durch iTRAQ™

Die massenspektrometrische Quantifizierung von Proteinen und deren Modifikationen stellt eine Schlüsseltechnologie in der aktuellen und zukünftigen Proteomforschung dar. Mit ihr lässt sich eine große Zahl Proteine in einem Experiment identifizieren und verschiedene Zustände miteinander vergleichen. Besonders in der Erforschung von posttranslationalen Modifikationen, welche als Ergebnis von Stimulierung oder pathologischen Zuständen in Zellen oder Geweben auftreten, wird durch Technologien wie iTRAQ™ ermöglicht. Durch die Verwendung von bis zu acht Markierungen lassen sich zeitliche Verläufe solcher Modifikationen verfolgen und so Signalwege identifizieren und charakterisieren. Gel-basierte Technologien wie die klassische 2D-Gelelektrophorese sind dazu in der Lage eine sehr hohe Zahl von verschiedenen Proteinen in komplexen Proben aufzutrennen und zu visualisieren. Eine wesentliche Limitation – die eingeschränkte Reproduzierbarkeit der Elektrophorese – konnte durch die Entwicklung der „Differentialen In Gel Elektrophorese“ (DIGE, Ünlü et al., 1997) umgangen werden. Methodische Probleme wie der geringe dynamische Bereich bei der Quantifizierung wie auch das geringe Auflösungsvermögen von Proteinen mit hohem bzw. niedrigem pI oder Molekulargewicht konnten bisher nicht abschließend gelöst werden. Gegenüber den Gel-basierten Methoden hat die massenspektrometrische Identifizierung von Peptiden nach chromatographischer Auftrennung (LC-MS/MS) Vorteile bei der Sensitivität, Signaldynamik und ist nicht in der Zugänglichkeit der oben genannten Proteinklassen eingeschränkt. Eine mehrdimensionale Chromatographie ermöglicht ein mit der 2D-Gelelektrophorese vergleichbares Auflösungsvermögen. Die Möglichkeit posttranslationale Modifikationen nicht nur zu detektieren und zu quantifizieren, sondern auch zu lokalisieren, prädestiniert die massenspektrometrische Quantifizierung von Proteinen besonders für die Analyse von Signal-Transduktionsvorgängen.

Wie bei allen quantifizierenden Technologien ist die statistische Grundlage einer Messmethode von erheblicher Bedeutung. Dabei muss zum einen das ausgelesene Signal und sein Rauschverhalten charakterisiert werden, zum anderen sollte bei vergleichenden Methoden eine Abgrenzung von nicht reguliertem und reguliertem Zustand möglich sein, so dass signifikante Regulationen von solchen unterschieden werden können, welche aufgrund von Schwankungen des ausgelesenen Signals zustande kommen. Im Falle von iTRAQ™ resultiert das ausgelesene Signal aus der massenspektrometrischen Detektion eines Reportermoleküls. Dabei ergibt sich der ausgelesene Wert aus der Summe der Nachweisereignisse am Detektor pro definierter Zeiteinheit. Da in der Massenspektrometrie die Anzahl der Detektionen („Counts“) eines Moleküls von seiner Ionisierbarkeit – also der Fähigkeit elektrische Ladungen aufzunehmen – abhängt, ist es allgemein nicht möglich, von einer Signalintensität auf die Abundanz eines Moleküls in der vermessenen Probe zu schließen. Allerdings sind die verschiedenen iTRAQ™-Moleküle isobar, haben also identische Gesamtmassen. Erst bei Ihrer Fragmentierung im Massenspektrometer entlassen sie Reportermoleküle, welche sich aufgrund des Einbaus verschiedener Isotopen, in ihrem Masse zu Ladungsverhältnis unterscheiden, aber dieselbe molekulare Struktur aufweisen. Die verschiedenen Isotopen haben keinen Einfluss auf die Ionisierbarkeit der Reportermoleküle, so dass das Verhältnis der Anzahl der Detektionen beider Reportermoleküle zueinander ihre relative Häufigkeit widerspiegelt.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die experimentellen Parameter zu charakterisieren und die Grundlage zur Modellierung der hier gemachten Beobachtungen zu schaffen. Die anschließende mathematische Modellierung durch F. Klawonn (Fachhochschule Wolfenbüttel, Computerwissenschaften) und C. Hundertmark (HZI Braunschweig, Proteomgruppe) sollte es ermöglichen, statistisch signifikante Regulationsfaktoren von solchen zu unterscheiden, welche aufgrund von Signalschwankungen erzeugt werden. Weiterhin sollte ermittelt werden, welche Reportermolekül-Masse auch in nicht markierten Peptiden detektierbar ist und somit zu falsch positiven Signalen führen kann.

4.1.1 Häufigkeit der Detektion falsch-positiver iTRAQ™-Reporter

Die in dieser Arbeit verwendeten iTRAQ™-Reagenzien entlassen im Massenspektrometer unter MS/MS-Bedingungen Reportermoleküle mit den Massen von etwa 114.1, 115.1, 116.1 und 117.1 Dalton. Damit haben die Reporter Molekülmassen, die im niedermolekularen Bereich des Massenspektrums liegen. Um zu ermitteln, wie häufig Massen detektiert werden, welche je nach Massegenauigkeit des verwendeten Massenspektrometers nicht von tatsächlichen Reporter Massen unterschieden werden können, wurde eine nicht iTRAQ™ markierte Probe analysiert. Dabei wurden automatisch die Signalintensitäten bei 114.1112, 115.1083, 116.1116 und 117.1150 Da ausgelesen und die Werte nach der Größe sortiert. Das Auslesen der Reporterintensitäten erfolgte in einem Intervall von ± 0.02 Da um die exakte Masse jedes Reporters. Die ausgelesenen Reporterintensitäten wurden nach ihrer Intensität sortiert und in Abbildung 4.1 über der Peptidnummer aufgetragen.

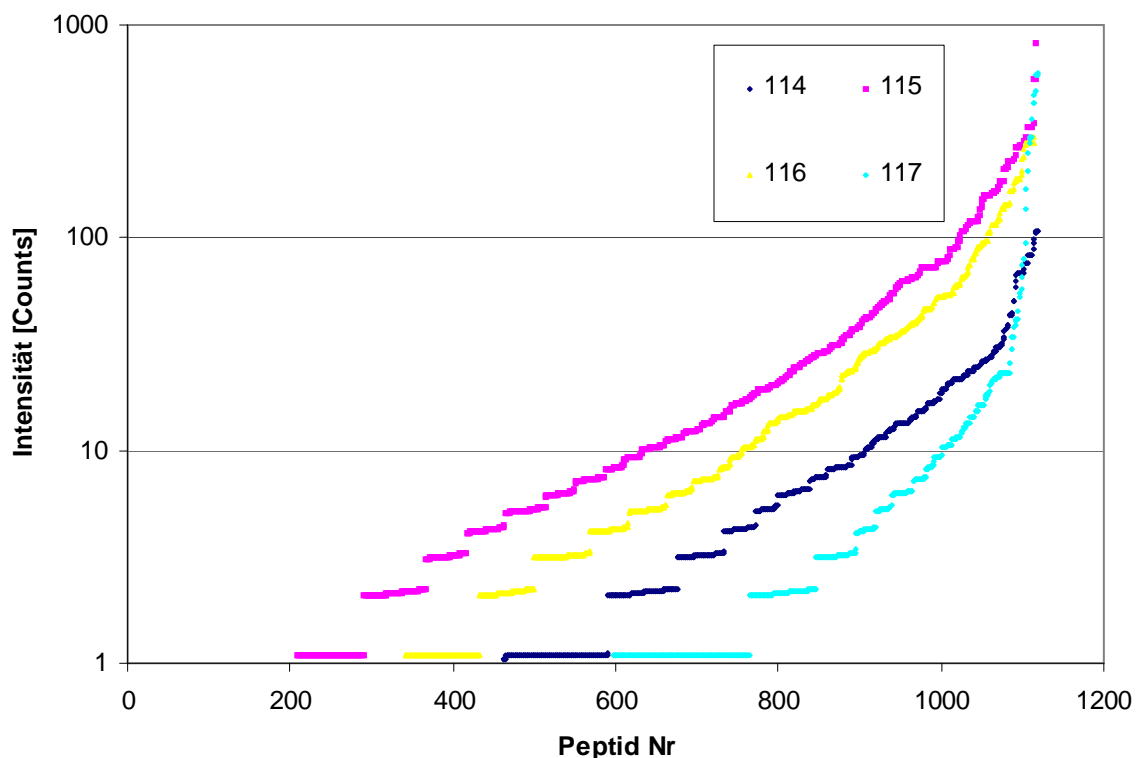


Abb. 4.1 Signalintensitäten in einer nicht iTRAQ™-markierten Probe In einem komplexen Proteingemisch wurden die Signalintensitäten in dem Massenbereich, in dem iTRAQ™-Reporter zu detektieren sind, ausgelesen (Massenintervall: $\pm 0,02$ Da um die exakte Reporter Masse). Falsch positive iTRAQ™-Signale treten am häufigsten bei 115 Da und am seltensten bei 117 Da auf.

So wurden bei 203 von 1118 Peptiden bei 115 Da kein Signal festgestellt. Bei Peptid 207 bis 289 wurde 1 Einheit gezählt. Bezogen auf die Masse 116 wurde bei Peptid 1 bis 339 kein Signal detektiert, wobei bei 114 460 und bei 117 595 Peptide kein Signal zeigten. Während mehr als 50% aller Peptide bei 115 Da ein Signal von 10 Einheiten oder mehr haben, trifft das bei 117 Da nur auf etwa 10% aller Peptide zu. Somit ist mit verschiedener Wahrscheinlichkeit für die verschiedenen Reportermassen ein falsch positives Signal zu erwarten. Die Reportermasse 115 Da wird in einer nicht markierten Probe in 81,8% aller MS/MS-Spektren detektiert. Dabei werden Signalintensitäten erreicht, wie sie auch bei markierten Peptiden zu erwarten wären. Die Reportermasse 117 Da wird dagegen nur in 46,8% aller Messungen detektiert. Gleichzeitig sind die Signalintensitäten geringer. Die detektierten Massen entstehen durch interne Fragmentierungen von Peptiden. So wird durch die Aminosäuren Alanin-Alanin am N-Terminus ein a_2 Ions generiert, welches mit oft großer Intensität bei 115 Da detektiert werden kann. Gleiches gilt für das b_2 -Ion der Aminosäuresequenz Glycin-Glycin. Diese Fragment-Ionen stellen ein Problem für die Quantifizierung von Proteinen mit iTRAQ™ dar. Abbildung 4.1 ist zu entnehmen, dass die verschiedenen Reportermassen verschieden stark mit falschen Reportersignalen belastet sind. Falls bei der quantitativen Analyse realer Proben nicht alle vier iTRAQ™-Reagenzien benötigt werden, sollte die Belastung der einzelnen Reporter-Kanäle in der Auswahl der Reagenzien berücksichtigt werden. Zudem wird durch die Detektion falscher Reportersignale deutlich, dass eine hohe Massengenauigkeit des Massenspektrometers im niedermolekularen Bereich für das Auslesen der Reporterintensitäten und damit für die Ermittlung von Regulationsfaktoren essentiell sind. Eine hohe Massengenauigkeit ermöglicht eine Verkleinerung des Ausleseintervalls um die Reportermassen, was die Wahrscheinlichkeit, ein falsches Reportersignal zu detektieren, reduziert.

4.1.2 Das Verhalten von iTRAQ™-Reportern in nicht-regulierten Proben

Bei der quantitativen Analyse von realen Proben ist davon auszugehen, dass der Großteil der enthaltenen Proteine nicht differentiell reguliert ist, so dass die Reporterintensitäten im Massenspektrum eine gleiche Intensität zeigen sollten. Um ein solches Verhalten nachzustellen, wurde ein definiertes Proteingemisch aus den

Proteinen Ovalbumin, Conalbumin, Aldolase, Ferritin und Thyroglobulin (GE Healthcare) verdaut, in gleiche Teile aufgeteilt und mit den iTRAQ™-Reagenzien 115 und 117 markiert. Diese Probe wurde durch LC-MS/MS analysiert und die Intensität der iTRAQ™-Reporter automatisch ausgelesen. Der Regulationsfaktor für jedes Reporterpaar wurde durch $\text{Counts [117]} / \text{Counts [115]}$ errechnet und über die Reporterintensität des Reporters 115 aufgetragen (Abb 4.2).

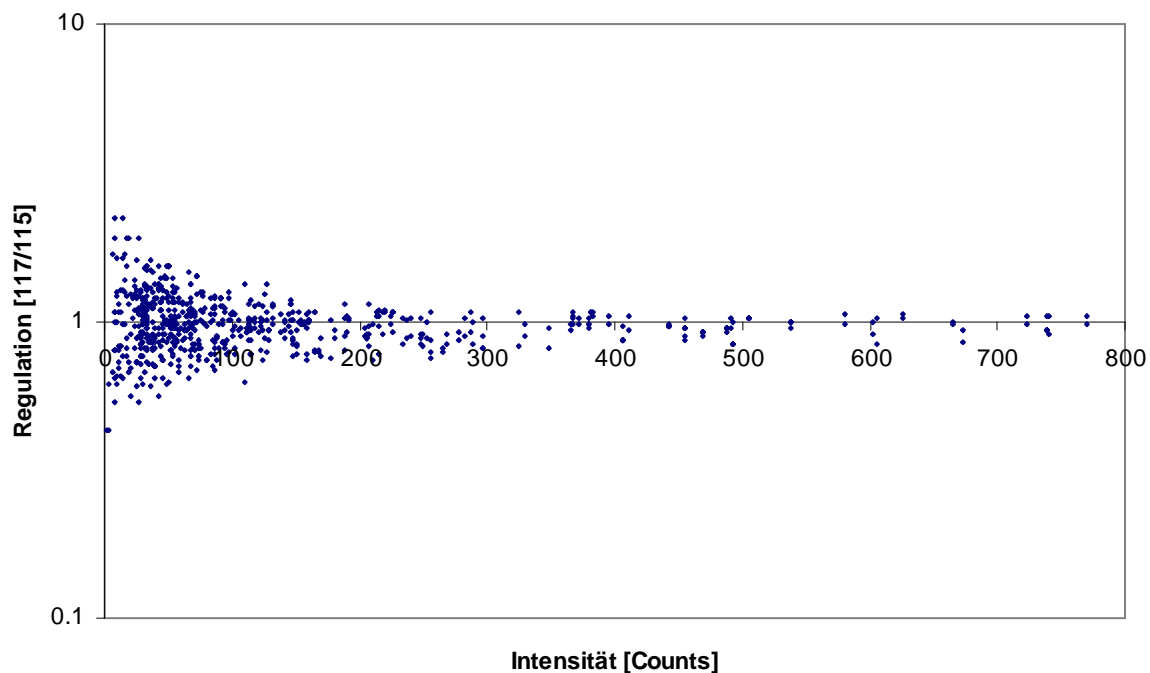


Abb. 4.2 Abhängigkeit der Varianz des Regulationsfaktors von der Intensität der iTRAQ™-Reporterionen In einer nicht differentiell regulierten Probe sollten beide Reporterintensitäten auf exakt gleichem Niveau liegen – der Regulationsfaktor (Quotient der Reporterintensitäten) ist 1. Eine reale Analyse einer nicht regulierten Probe zeigt ein abweichendes Verhalten. Je höher die Reporterintensität ist, desto kleiner ist die Abweichung von 1.

Abbildung 4.2 zeigt die Varianz des Regulationsfaktors von der gemessenen Intensität des Regulationsfaktors. Dabei ist zu erkennen, dass bei niedrigen Reporterintensitäten die Abweichung vom in der Probe eingestellten Regulationsfaktor größer ist, als bei höheren Reporterintensitäten. Die Varianz nimmt bis zu einer Intensität von 300 bis 400 Counts ab, und ändert sich dann auch bei höheren Intensitäten nur noch unwesentlich. Die Ursache für dieses Verhalten setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen. Gerade bei niedrigen Reporterintensitäten spielt das bereits in 4.1.1 beobachtete chemische Rauschen im

Massenspektrum eine Rolle, da hier auch unspezifische Signale geringer Intensität im Massenbereich der iTRAQ™-Reporter bei der Berechnung des Regulationsfaktors stark ins Gewicht fallen. Dieser intensitätsabhängige Varianzanteil fällt bei hohen Reporter-Intensitäten weniger ins Gewicht. Die hier beobachtete Varianz resultiert zum wesentlichen Teil aus den Spezifikationen des Massenspektrometers. Die Sensitivität des Detektors zusammen mit der Qualität der Signalverstärkung im Detektor hat einen Einfluss auf den intensitätsunabhängigen Varianzanteil. Die Charakterisierung beider Varianzanteile wurde im folgenden weiter untersucht, um eine mathematische Modellierung zu ermöglichen.

4.1.3 Das Rauschverhalten der iTRAQ™-Reporter

Wie in 4.1.2 gezeigt werden konnte, hat die Intensität der Reportersignale einen Einfluss auf die Signifikanz des Regulationsfaktors. Durch eine Versuchsreihe sollte das Rauschverhalten der iTRAQ™-Reporter für verschiedene Intensitätsbereiche simuliert werden. Dazu wurden synthetische Peptide verwendet, welche nach iTRAQ™-Markierung mit dem Reagenz 115 unter Verwendung verschiedener Kollisionsenergien massenspektrometrisch vermessen wurden. Dies führt zu einer Variation des Fragmentierungsgrades des Peptids und resultiert in einer veränderten Intensität der detektierten Reportermasse. Es wurde ein Peptid verwendet, welches wegen eines Lysines in der Aminosäurekette mit 2 iTRAQ™-Molekülen reagiert (Sequenz: VSDFGLTK) und somit ein starkes Reportersignal erzeugt. Zusätzlich wurde ein Peptid analysiert, welches kein Lysin enthält, also nur am N-Terminus eine iTRAQ™-Markierung trägt (Sequenz: IADPEHDHTGFLTEYVATRWYR). Dies resultiert in geringeren Reporter-Intensitäten. Über eine Spritzenpumpe in das Q-ToF Massenspektrometer eingebracht, wurde das jeweilige Peptid detektiert und automatisch für ein Fragmentierungsexperiment ausgewählt. Im Fragmentierungs-Modus (MS/MS) wurde das Peptid abhängig von der eingestellten Kollisionsenergie fragmentiert. Mit jeder Kollisionsenergie wurden 100 Einzelspektren aufgenommen. Anschließend wurde die Kollisionsenergie verändert. Zur Auswertung wurden wie in echten Proben die Signale von vier Einzelspektren aufsummiert und eine mathematische Glättung des Signals vorgenommen (Savitzki-Golay Glättung über ± 7 Kanäle). Anschließend wurde das Spektrum durch Zentroidierung auf ein

Strichspektrum reduziert. Dieses Vorgehen entspricht der Prozessierung wie sie auch bei echten Proben automatisch vorgenommen wird. Es wurden für acht verschiedene Kollisionsenergien jeweils 100 Spektren aufgenommen. In Abbildung 4.3 wurden beispielhaft drei Datenreihen für verschiedene Kollisionsenergien aufgetragen. Dargestellt wurden die Logarithmen der Signalintensität nach Größe sortiert über der Nummer der Messung. Es lässt sich erkennen, dass bei einer niedrigen Signalintensität die Steigung der Regressionsgeraden größer ist, als bei einer höheren Signalintensität. Dies ist gleichbedeutend mit einer größeren Varianz des Signals um einen Mittelwert.

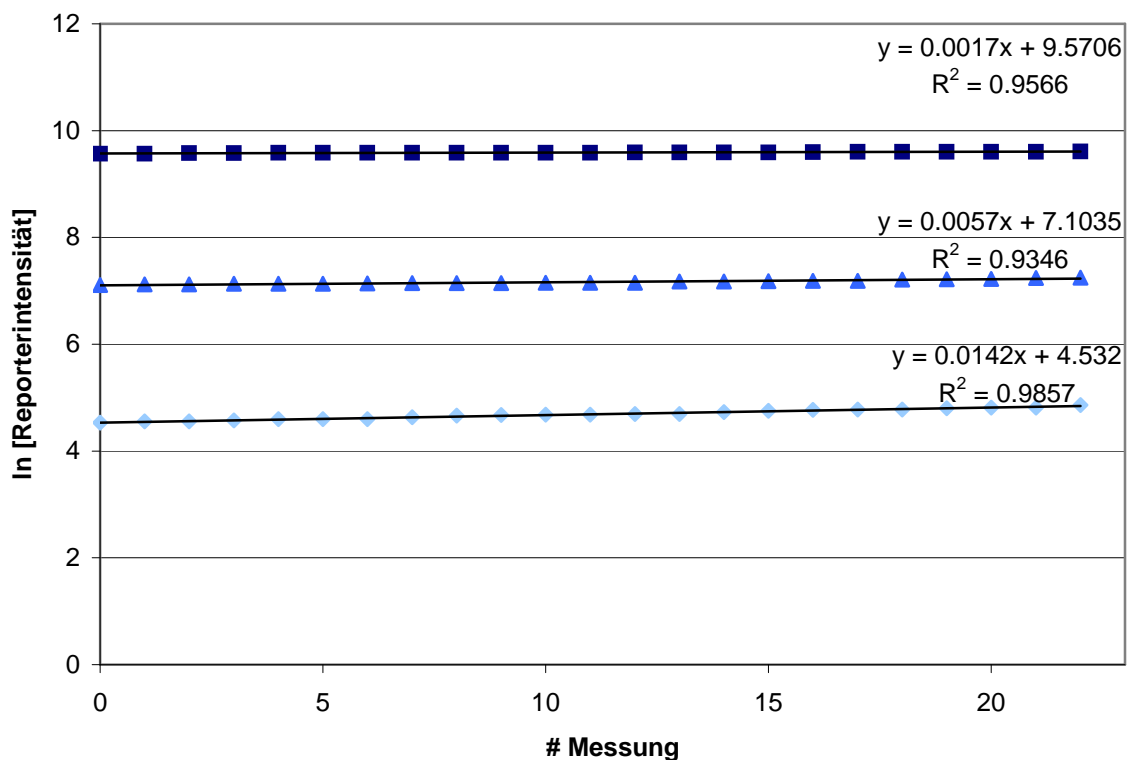


Abb. 4.3 Intensitätsabhängiges Rauschen der iTRAQ™-Reporterionen Die Signalintensitäten wurden logarithmiert und nach ihrer Intensität sortiert. Die Steigung der Regressionsgeraden repräsentiert das Rauschverhalten der iTRAQ™-Reporterionen in verschiedenen Intensitätsbereichen.

Trägt man die Steigung der Regressionsgeraden aller Messreihen gegen den Logarithmus der Reporterintensitäten auf (Abb. 4.4), erkennt man, dass die Varianz mit einer Zunahme des Reportersignals abnimmt, also die Varianz der Reporterintensitäten von der Signalintensität abhängt. Dieser Anteil an der Gesamtvarianz des iTRAQ™-Signals entspricht dem „relativen Rauschen“.

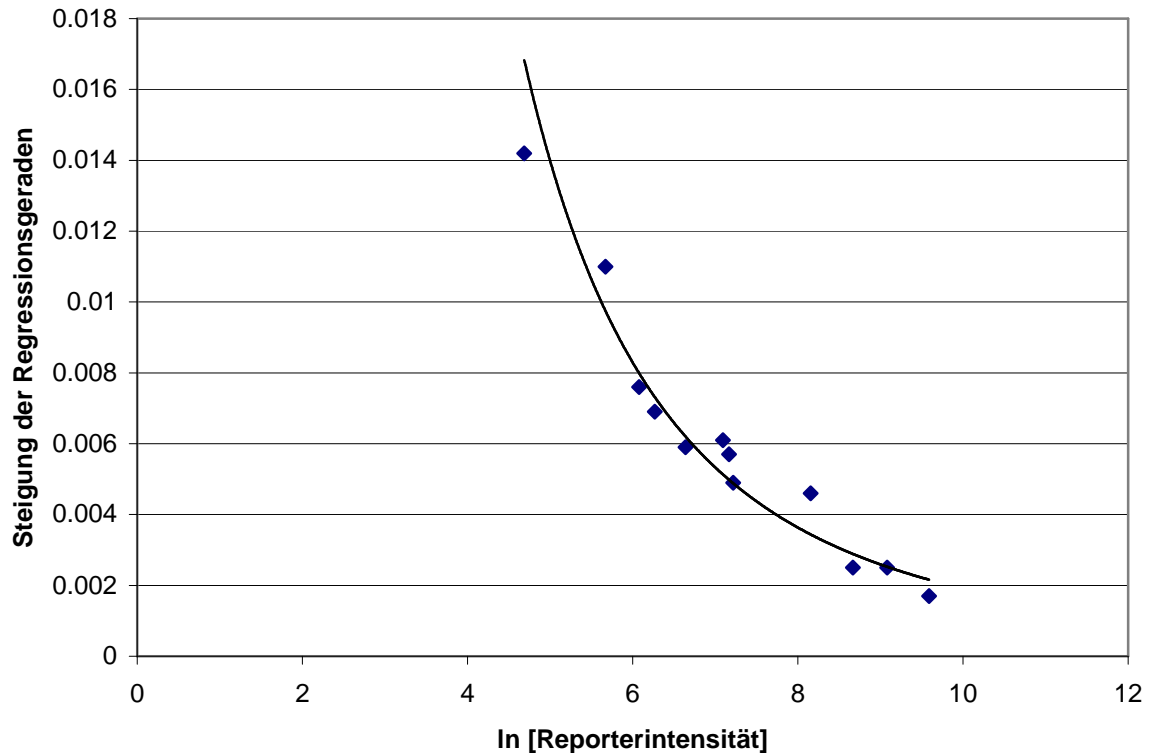


Abb. 4.4 Abnahme des Rauschens mit steigender Reporterintensität Die Steigung der Regressionsgeraden als Maß für die Stärke des Reporter-Rauschens sinkt mit steigender Reporterintensität. Wegen des Zusammenhangs zur Reporterintensität wird es als relatives Rauschen bezeichnet.

Berücksichtigt man die Auftragung des Regulationsfaktors über die Reporterintensität (Abb. 4.2), erkennt man, dass das Rauschen auch bei hohen Intensitäten nicht Null wird, sondern sich einem definierten Wert annähert. Dieser zweite Varianzanteil entspricht dem „absoluten Rauschen“ der iTRAQ™-Reporter und resultiert aus Faktoren, deren Einfluss auf die Reporterintensitäten nur schwer zu charakterisieren sind.

4.1.4 Die Validierung des Rauschmodells

Die in 4.1.1 und 4.1.2 gemachten Beobachtung, sowie die in 4.1.3 generierten Daten wurden durch F. Klawonn (Fachhochschule Wolfenbüttel, Computerwissenschaften) für die mathematische Modellierung des Rauschverhaltens von iTRAQ™-Reportern in der Massenspektrometrie verwendet. C. Hundertmark (HZI Braunschweig,

Proteomgruppe) führte die Implementierung des mathematischen Modells in ein Programm zur automatischen Berechnung von Regulationsfaktoren unter der Berücksichtigung des Rauschverhaltens durch. Bei der mathematischen Betrachtung des Rauschverhaltens von iTRAQ™ sei auf die Veröffentlichung von Klawonn et al. (2006) und auf die Dissertation von C. Hundertmark verwiesen.

Die in 4.1.3 generierten Daten konnten dazu verwendet werden, um das Rauschverhalten der iTRAQ™-Reporter in Abhängigkeit von ihrer Intensität im Massenspektrum mathematisch zu erfassen (Abb. 4.5).

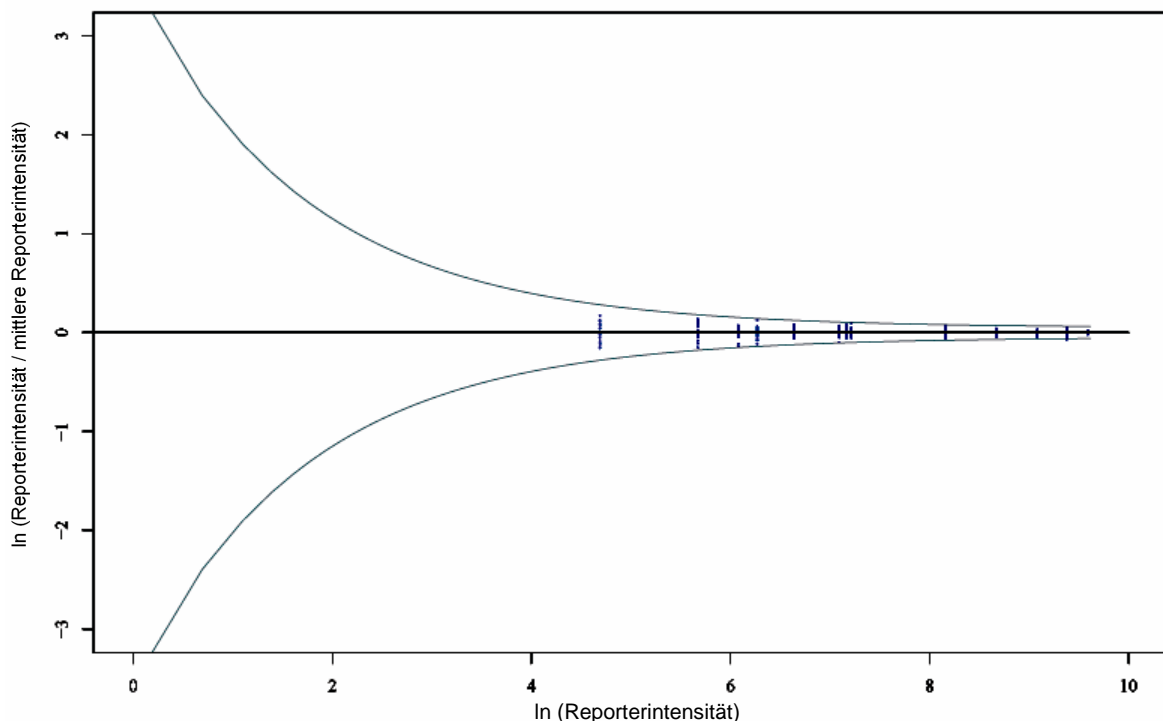


Abb. 4.5 Darstellung des modellierten Rauschverhaltens der iTRAQ™-Reporterionen Die aus 13 Messreihen (blaue Punkte) ermittelte intensitätsabhängige Varianz der iTRAQ™-Reporter wurde durch F. Klawonn (Fachhochschule Wolfenbüttel, Computerwissenschaften) und C. Hundertmark (HZI Braunschweig, Proteomgruppe) modelliert (graue Kurven). Die Regulationsfaktoren nicht regulierter Peptide befinden sich zwischen den Kurven, die von regulierten Peptiden ober- und unterhalb.

In einer nicht-regulierten Probe liegt der erwartete Regulationsfaktor bei 1. Gilt die Annahme, dass 95% aller ermittelten Regulationsfaktoren in einer nicht-regulierten Probe innerhalb eines durch die Rauschparameter definierten Intervalls liegen sollen, ergibt sich der in Abbildung 4.5 dargestellte, Trichter-förmige Erwartungsraum,

zwischen dessen Grenzen ein Regulationsfaktor liegen sollte, falls es sich um ein nicht-reguliertes Protein handelt. Liegt der Regulationsfaktor außerhalb des durch das Rauschmodell definierten Trichters, handelt es sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% um ein differentiell reguliertes Protein.

Zur Validierung des in der Arbeit von C. Hundertmark (HZI Braunschweig, Proteomgruppe) erstellten mathematischen Rauschmodells wurde eine definiertes Proteingemisch aus den Proteinen Ovalbumin, Conalbumin, Aldolase, Ferritin und Tyroglobulin (HMW-Kit, Amersham) verdaut, zu gleichen Teilen aufgeteilt und mit den iTRAQ™-Reagenzien 115 und 117 markiert. Anschließend wurden die Proben vereinigt und in 10 verschiedenen Verdünnungen durch LC-MS/MS vermessen. Die Datensätze wurden vereinigt und die Reporterintensitäten für jedes identifizierte Peptid ausgelesen und Regulationsfaktoren berechnet. In Abbildung 4.6 wurden die ermittelten Regulationsfaktoren gegen den Logarithmus der Reporterintensität eines Reporters (115) aufgetragen. Gleichzeitig erkennt man die mit dem Rauschmodell berechneten intensitätsabhängigen Grenzen zwischen denen sich die Regulationsfaktor im Idealfall befinden müsste.

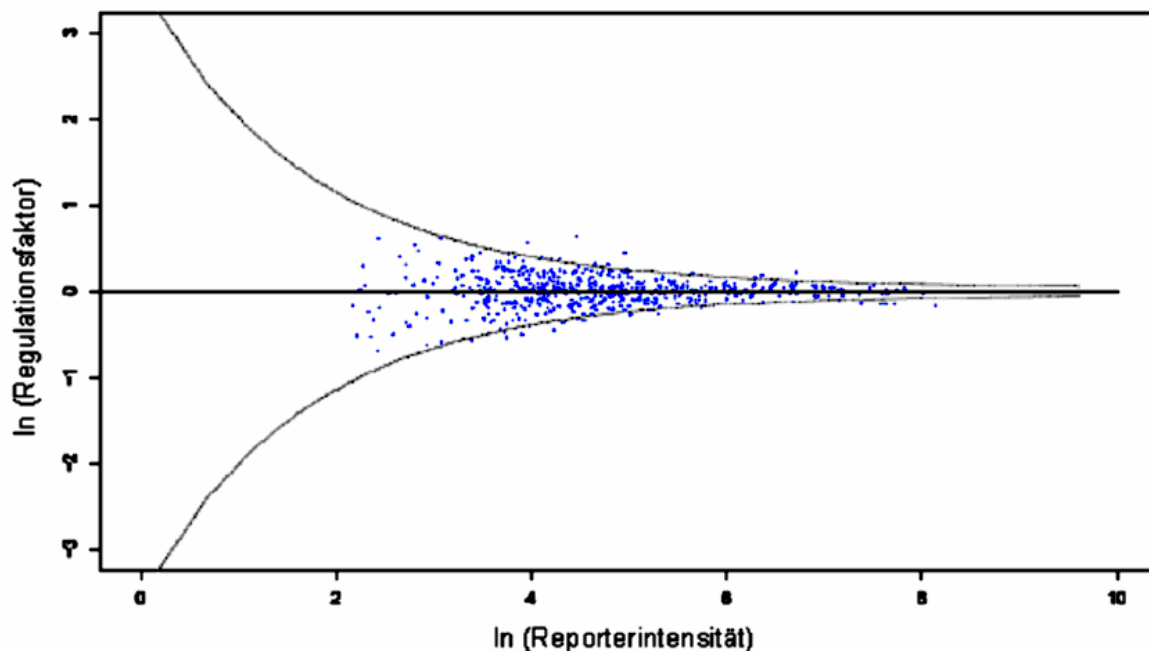


Abb. 4.6 Validierung des Rauschverhaltens mit einer definierten 1:1 Probe Ein definiertes Proteingemisch wurde verdaut, zu gleichen Teilen aufgeteilt und mit verschiedenen iTRAQ™-Reportern markiert. Die Regulationsfaktoren für 563 Peptide wurden über die Intensität aufgetragen. 93,8% aller Messpunkte liegen zwischen den durch das Rauschmodell berechneten Kurven und gelten demnach als nicht reguliert.

In Abb. 4.6 ist zu sehen, dass 528 von 563 Messpunkten innerhalb der mittels des Rauschmodells berechneten Grenzen liegen. Das entspricht einem Anteil von 93,8% aller Datenpunkte. Somit konnte das mathematische Modell zum intensitätsabhängigen Rauschen von iTRAQ™-Reportern experimentell erfolgreich validiert werden. Damit ist das Modell in der Lage zu definieren, welche Reporterintensität notwendig ist, um einen statistisch signifikanten Regulationsfaktor zu ermitteln und ermöglicht in realen Experimenten eine Berechnung statistisch signifikanter Regulationsfaktoren.

4.1.5 Untersuchungen zur Reaktionskinetik von iTRAQ™-Reagenzien

Eine elementare Voraussetzung für eine Quantifizierung von Proteinen, welche auf einer differentiellen, chemischen Markierung beruht, ist die Vollständigkeit der Reaktion. Falls nicht alle Peptide in der Referenz-Probe chemisch markiert wurden, während in der zu vergleichenden Probe die Reaktion vollständig ablief, hat eine unvollständige Reaktion unmittelbaren Einfluss auf die Intensität des ausgelesenen Signals. Im Falle von iTRAQ™ entspräche das Intensitätsverhältnis der Reporter-Ionen nicht mehr dem relativen Verhältnis des markierten Peptids und eine Quantifizierung des Peptids wäre unmöglich. Die Entstehung eines solchen Effektes ist auf zwei verschiedene Arten denkbar: i) Bei einer der zu vergleichenden Proben wurden mehr als 100 µg Protein eingesetzt (Herstellerangabe, Applied Biosystems). Das führt dazu, dass im Reaktionsgemisch mehr primäre Aminogruppen vorhanden sind, als iTRAQ™-Moleküle, so dass nicht jedes Peptid markiert werden könnte. ii) Die Reaktion ist nach den vom Hersteller angegebenen 60 Minuten noch nicht beendet. Da die iTRAQ™-Reagenzien bis auf eine differierende Isotopen-Verteilung chemisch identisch sind, ist eine identische Reaktionsgeschwindigkeit der iTRAQ™-Reagenzien mit den Peptiden bei jeweils gleicher Konzentration zu erwarten. Ein Teilbereich der umfassenden biochemischen Charakterisierung von iTRAQ™ war die Untersuchung, ob die Reaktionsgeschwindigkeit aller verfügbaren iTRAQ™-Reagenzien identisch ist. Dazu sollte mittels massenspektrometrischer Methoden eine Beobachtung der Reaktion in Echtzeit durchgeführt und analysiert werden.

Zur Untersuchung der Reaktionsgeschwindigkeiten der vier erhältlichen iTRAQ™-Reagenzien wurde ein Gemisch aus allen Reagenzien zu gleichen Teilen hergestellt und mit Ameisensäure zur Verbesserung der Ionisierung im Massenspektrometer angesäuert. Anschließend wurde dem Gemisch ein Peptid mit der Sequenz VSDFGLTK zugegeben über einen Zeitraum von 180 Minuten im Q-ToF Massenspektrometer analysiert. Bei saurem pH reagieren die iTRAQ™-Moleküle nicht mit dem Peptid. Stattdessen lässt sich eine Reaktion mit Wasser und Ethanol feststellen. Die Reaktion eines iTRAQ™-Moleküls mit einem Wasser-Molekül resultiert in einem Molekül mit einer detektierbaren Masse von 163 Dalton, Ethanol reagiert zu einem Molekül mit 192 Dalton. Die Masse der nicht reagierten iTRAQ™-Moleküle beträgt 260 Dalton (Massenangaben inklusive H^+). Die Intensitäten der drei Moleküle im Massenspektrum wurden für jeden Zeitpunkt addiert und die Anteile der drei Moleküle an diesem Gesamtsignal in Abbildung 4.7 gegen die Zeit aufgetragen.

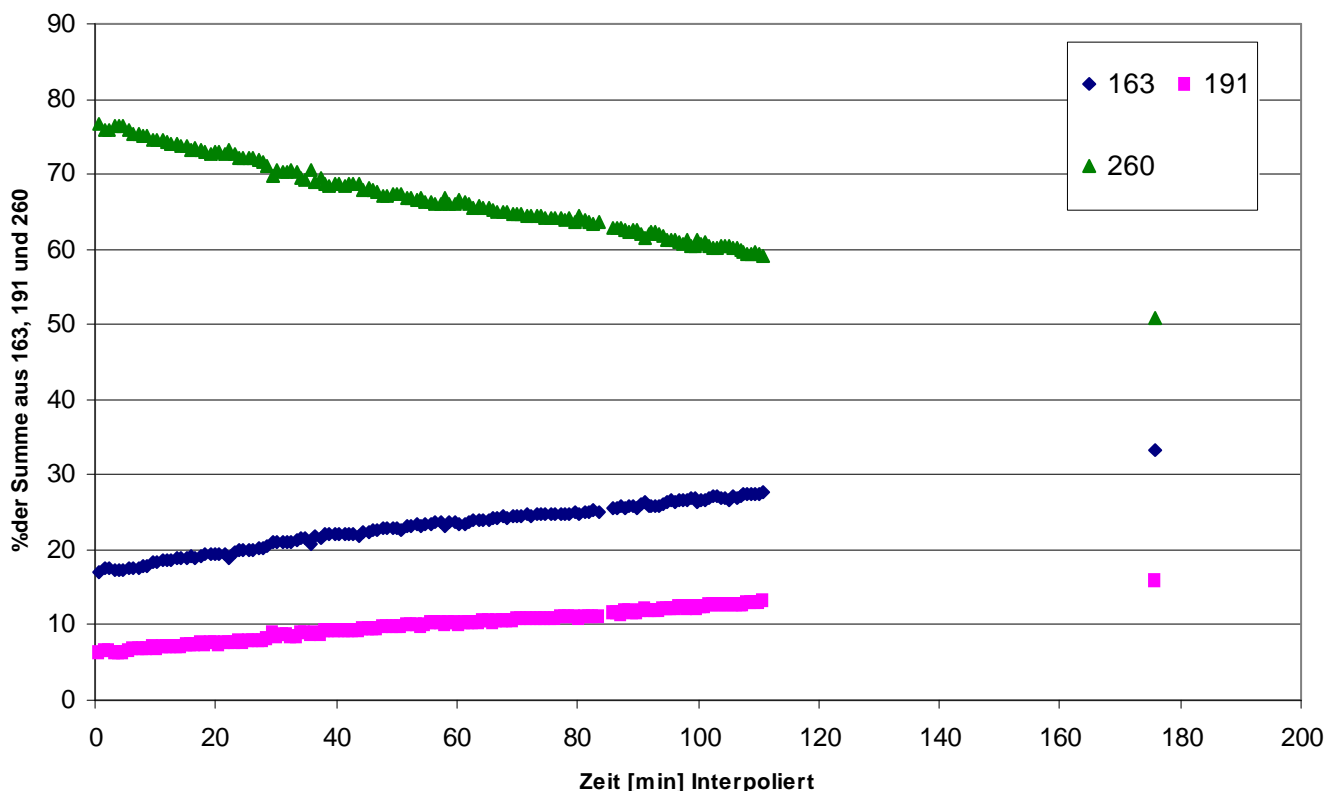


Abb. 4.7 Reaktionsverlauf von iTRAQ™-Molekülen mit Wasser und Ethanol Die Signalintensitäten von nicht-reagiertem iTRAQ™-Reagenz (260 Da), iTRAQ™ + Ethanol (191 Da) und iTRAQ™ + Wasser (163 Da) wurden zu jedem Zeitpunkt der Messung summiert und die Anteile der Einzelsignale gegen die Zeit aufgetragen. Die Abbildung zeigt die Abnahme der Konzentration des Eduktes und die Zunahme des Produktes. Die Versuchsanordnung ermöglichte ein Beobachtung der Reaktion am Massenspektrometer in Echtzeit.

In Abbildung 4.7 ist der zeitliche Verlauf der Reaktionen der iTRAQ™-Moleküle mit Wasser und Ethanol bei saurem pH zu erkennen. Zu Beginn der Reaktion liegen bereits Reaktionsprodukte aus Wasser + iTRAQ™ bei 163 Dalton und Ethanol + iTRAQ™ bei 191 Dalton vor. Demnach hat bereits vor dem Start der Reaktion ein Umsatz stattgefunden. Das Ethanol-Produkt trägt zu Beginn der Reaktion 6% zum Gesamtsignal bei, das Wasserprodukt 17%. Die Anteile steigen nach 180 Minuten annähernd linear bis auf 16 bzw. 33% an, während das Signal des nicht-abreagierten iTRAQ™-Reagenzes auf 51% sinkt. Auf diese Weise konnte die Reaktion der iTRAQ™-Moleküle in Echtzeit verfolgt werden. Die Reaktion mit Wasser scheint dabei schneller abzulaufen, als die Reaktion mit Ethanol.

Um die Fragestellung zu beantworten, ob die verschiedenen iTRAQ™-Moleküle eine verschiedene Reaktionsgeschwindigkeit zeigen, wurde von den Reaktionsprodukten aus iTRAQ™-Molekül + Wasser bzw. Ethanol zu Beginn der Reaktion und nach 180 Minuten jeweils 20 Fragmentspektren aufgezeichnet. Diese Spektren wurden aufsummiert und die iTRAQ™-Reporter ausgelesen (Abb. 4.8).

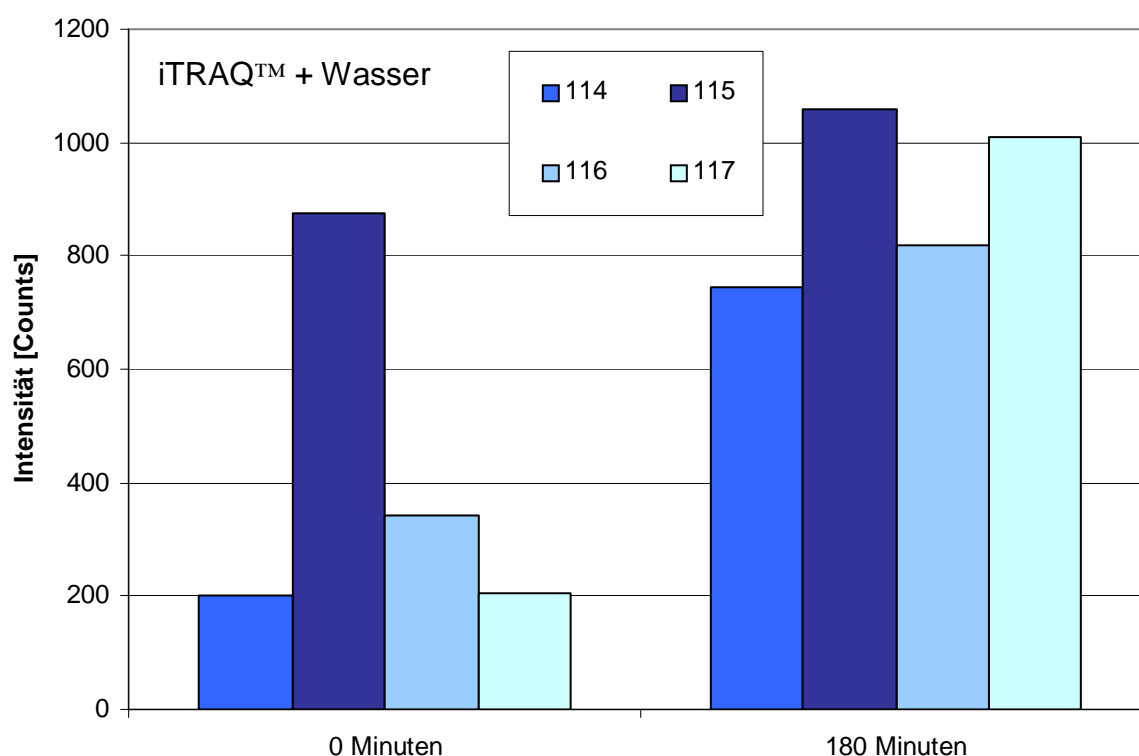


Abb. 4.8 Produktverteilung der Reaktion von iTRAQ™-Molekülen vor und nach der Reaktion mit Wasser iTRAQ™-Reagenzien 114- 117 wurden zu gleichen Teilen gemischt und die Reaktion mit Wasser in Echtzeit am Massenspektrometer verfolgt. Das Reaktionsprodukt wurde fragmentiert und die Intensitäten der einzelnen iTRAQ™-Reporter zu Beginn und am Ende der Messung ausgelesen.

Abbildung 4.8 zeigt die Verteilung der bereits mit Wasser abreagierten iTRAQ™-Moleküle zu Beginn der Reaktion und am Ende der Messung. Bei iTRAQ™-Reagenz 115 ist bereits zu Beginn der Reaktion ein wesentlich größerer Teil mit Wasser abreagiert als bei den anderen iTRAQ™-Reagenzien. Nach 180 Minuten erkennt man die stärkste Signalzunahme beim Reagenz 117, während 115 die kleinste Zunahme, also nur eingeschränkte Reaktivität zeigt. Die Signalintensitäten für das Reaktionsprodukt mit Ethanol sind in Abbildung 4.9 dargestellt.

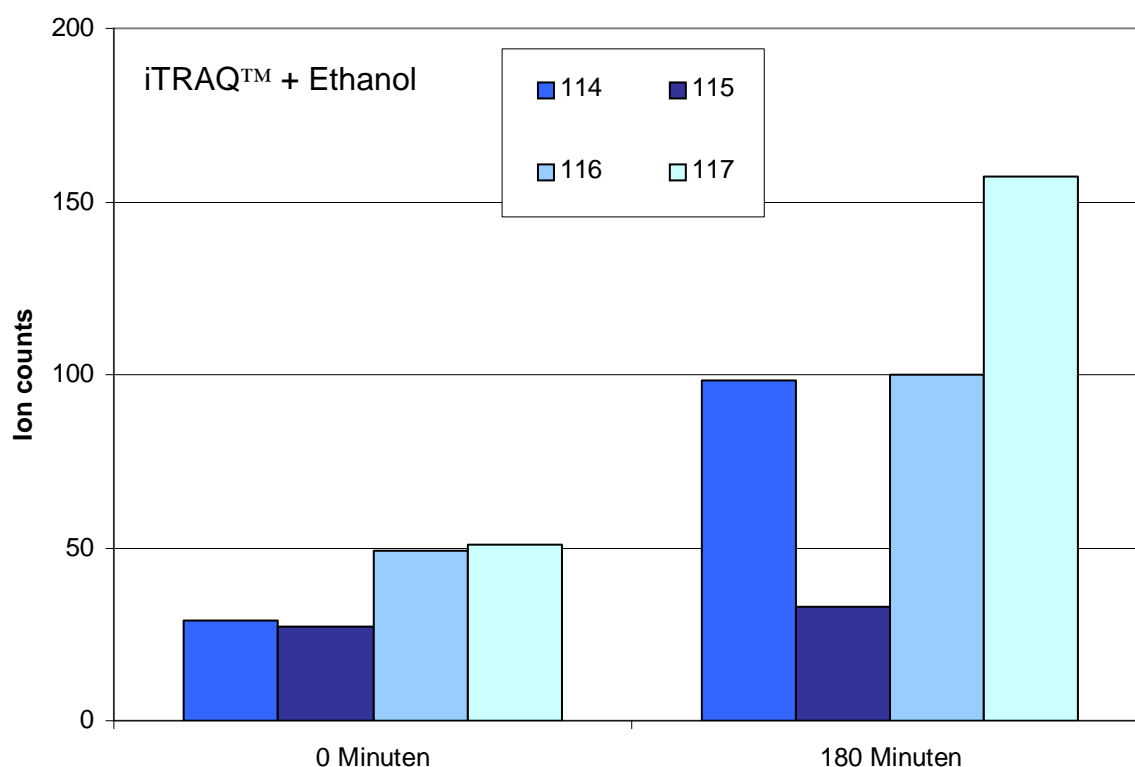


Abb. 4.9 Produktverteilung der Reaktion von iTRAQ™-Molekülen vor und nach der Reaktion mit Ethanol iTRAQ™-Reagenzien 114 - 117 wurden zu gleichen Teilen gemischt und die Reaktion mit Ethanol in Echtzeit am Massenspektrometer verfolgt. Das Reaktionsprodukt wurde fragmentiert und die Intensitäten der einzelnen iTRAQ™-Reporter zu Beginn und am Ende der Messung ausgelesen.

Zu Beginn der Reaktion mit Ethanol liegen die Reagenzien 116 und 117 bereits in etwa doppelter Menge im Vergleich zu 114 und 115 abreagiert vor. Nach 180 Minuten hat 115 nur wenig mit Ethanol reagiert, während 117 die stärkste Signalzunahme zeigt.

Betrachtet man in beiden Diagrammen die Signalzunahmen der einzelnen iTRAQ™-Moleküle, so ist erkennbar, dass das Reagenz 115 erheblich langsamer reagiert als die anderen Reagenzien. Im Falle des Reaktionsproduktes mit Wasser ist bereits schon zu Beginn der Reaktion ein wesentlicher Anteil des Reagenzes abreagiert. Das würde bedeuten, dass die Konzentration reaktionsfähiger iTRAQ™-Moleküle im Fall von 115 niedriger ist, als bei den anderen Reagenzien. Da die Reaktionsgeschwindigkeit von den Konzentrationen der Reaktanden abhängt, wäre ein Unterschied in der Reaktionsgeschwindigkeit durch eine niedrigere Konzentration reaktionsfähiger iTRAQ™-Moleküle mit einem 115 Da Reporter erklärbar. Vergleicht man jedoch die Signale der iTRAQ™-Moleküle 114 und 117, so sind sie zu Beginn der Reaktion nahezu identisch, woraus sich schließen lässt, dass eine beinahe identische Konzentration beider iTRAQ™-Molekülspezies im Reaktionsgemisch vorhanden war. Am Ende der Messung zeigt sich jedoch ein signifikanter Unterschied bei den Signalintensitäten. Dabei muss es sich also um einen Konzentrations-unabhängigen Effekt handeln.

4.2 Systematische Analyse von durch Internalin A Stimulation aktivierbarer Kinasen

Nach der Validierung von iTRAQ™ als Verfahren zur Quantifizierung von Proteinen durch Massenspektrometrie konnte die Methode für eine Untersuchung von Proteinen, welche nach einer Stimulation differentiell phosphoryliert wurden, angewendet werden. Da sich ein wesentlicher Teil dieser Arbeit mit der Aufklärung der durch das listerielle Protein Internalin A induzierten Signaltransduktion beschäftigt, wurde iTRAQ™ zur Quantifizierung von Phosphorylierungsereignissen nach einer Stimulation zweier verschiedener Zelltypen mit Internalin A angewendet. Dazu wurde nach einer 5-minütigen Inkubation von MCF7 und Caco-2 Zellen mit Internalin A-haltigem Medium die phosphorylierten Proteine mittels IMAC („Immobilized Metal Affinity Chromatography“) angereichert und durch proteolytische Spaltung Peptide generiert. Anschließend wurden die Peptide aus induzierten und nicht induzierten Zellen differentiell mit iTRAQ™-Reagenzien markiert und vereinigt. Darauf folgte eine 2-dimensionale Auftrennung der Peptide zunächst mit SCX- („Strong Cation Exchange“) und anschließend mit RP- („Reversed Phase“)

Chromatographie (Abb. 4.10). Die Identifikation der angereicherten Phosphoproteine erfolgte mittels Massenspektrometrie. Neben der Identität des Phosphoproteins wird durch iTRAQ™ eine Quantifizierung möglich, so dass Aussagen darüber getroffen werden können, ob ein Protein infolge der Stimulation mit Internalin A phosphoryliert wurde. Da zwei verschiedene Zelllinien verwendet wurden, kann angenommen werden, dass die Proteine, welche in beiden Zelllinien reguliert gefunden wurden, als Ergebnis der Internalin A Stimulation phosphoryliert wurden.

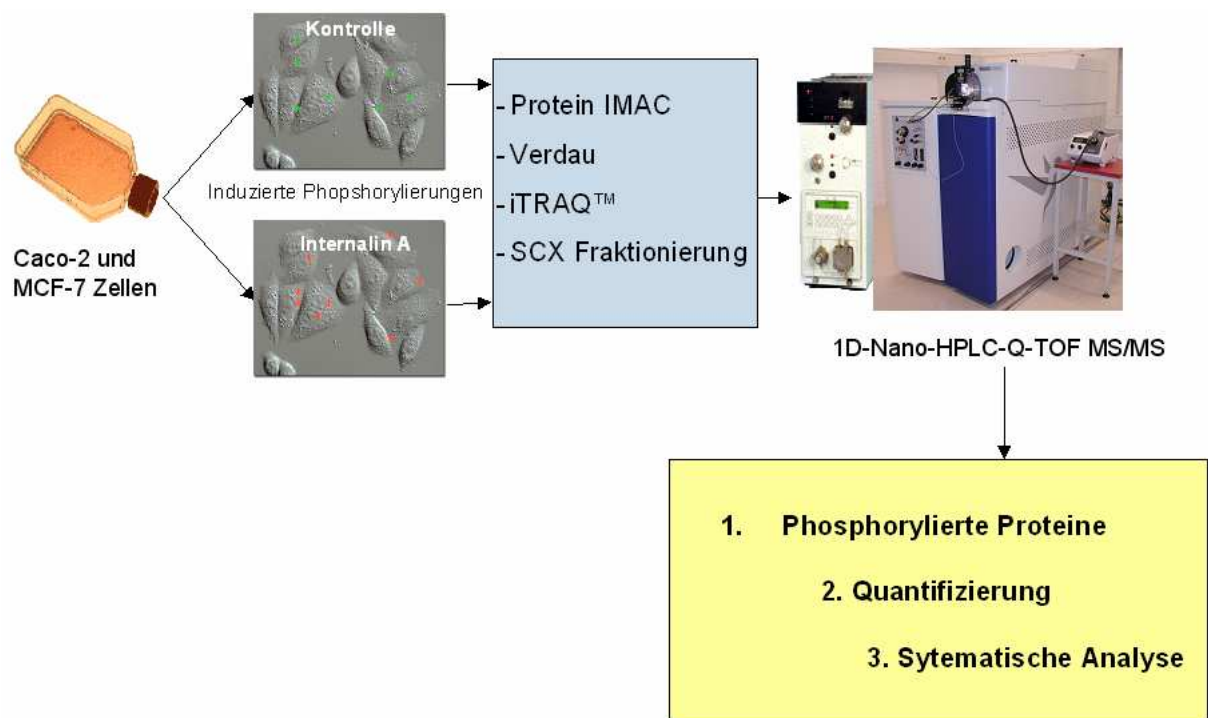


Abb. 4.10 Ablaufplan zu Untersuchung von Internalin A induzierten Phosphorylierungsereignissen Zellen zweier Zelltypen wurden für 5 Minuten mit Internalin A inkubiert. Phosphorylierte Proteine wurden nach Lyse durch IMAC angereichert, verdaut und mit iTRAQ™ markiert. Nach 2-dimensionaler chromatographischer Auftrennung folgte die auf Massenspektrometrie beruhende Identifikation und Quantifizierung der Phosphoproteine. Die systematische Analyse differentiell phosphorylierter Proteine lässt auf eine Internalin A abhängige Aktivierung von Kinasen schließen.

Damit richtet sich die Methode auf die Identifizierung von Kinase-Substraten. Obwohl durch die in Abbildung 4.10 vorgestellte Methode keine Phosphorylierungsstellen lokalisiert oder die Aktivierung von Kinasen nachgewiesen werden kann, lassen sich die so generierten Daten zu einer systematischen Suche nach solchen Kinasen nutzen, welche in anderen Veröffentlichungen als Interaktionspartnern der hier als phosphoryliert identifizierten Proteine beschrieben wurden. Ziel dieses Ergebnisteils

ist es, durch eine systematische Analyse von Kinasesubstraten Netzwerke zu generieren, welche Vermutungen über den Aktivitätsstatus von Kinasen zulassen. Solche Netzwerke können zur Identifizierung von Kinasen führen, welche als Resultat einer Stimulation von Zellen mit Internalin A aktiviert worden sein könnten.

4.2.1 Identifikation und Quantifizierung phosphorylierter Proteine

Die Analyse führte zu einer Sequenzierung von 4051 Peptidsequenzen aus 627 Proteinen. Für jedes Peptid wurde in Abhängigkeit der Reporterintensitäten eine Schätzung des Regulationsfaktors durchgeführt und ein Regulationsfaktor für das Protein bestimmt. Für die weitere Datenanalyse wurden nur solche Proteine verwendet, welche einen geschätzten Regulationsfaktor von 1,2 und größer aufwiesen. Proteine, welche in beiden verwendeten Zelllinien einheitlich reguliert gefunden wurden, sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Tabelle 4.1 Differentiell phosphorylierte Proteine in MCF7 und Caco-2 Zellen nach Internalin A Stimulation Nach 5-minütiger Stimulation von MCF7 und Caco-2 Zellen wurden Phosphoproteine angereichert und differentiell markiert. Die Regulationsfaktoren entsprechen der Abundanz des Proteins relativ zur nicht stimulierten Kontrolle

Sprot ID	Name	Funktion	Regulationsfaktor:	MCF7	Caco2
O60551	NMT2	Myristoyl-Transferase		1.22	1.28
Q9UI08	EVL	Ena VASP Protein-Familie, Modulator des Zytoskeletts		1.23	1.23
Q07866	KLC1	Kinesin light chain 1, Transport von Organellen		1.28	1.22
Q8TEA8	DTD1	tRNA Acethylase		1.34	3.90
Q13523	PRP4B	PRP4, Prozessierung von pre-mRNS		1.36	1.41
Q6P2Q9	PRP8	Komponente des Splicosomes, Prozessierung von pre-mRNS		1.59	1.52
Q9H267	VP33B	Vesikel vermittelter Protein-Transport, Fusion von Endosom und Lysosom		1.68	1.74
P82650	RT22	Komponente der mitochondrialen Ribosomen		1.81	6.01
Q9H3Y6	SRMS	Tyrosin Kinase der Src Kinase Familie		1.84	2.20
O95747	OXSR1	Serine/Threonin Kinase, Regulation des Zytoskeletts		1.92	1.92
Q9BVJ6	UT14A	Biogenese von Ribosomen		6.71	1.92

4.2.2 Ermittlung potentieller „Upstream“-Kinasen

Mittels des kommerziell erhältlichen Computerprogramms Pathway Studio 5.0 (Ariadne Genomics) wurde nach Kinasen gesucht, welche mit den in MCF7 und Caco-2 Zellen phosphorylierten Proteinen interagieren können. Datengrundlage für diese Suche war die Datenbank Resnet 5 (Ariadne Genomics), in der mehr als 1,25 Millionen bekannte Interaktionen zwischen 106749 Proteinen und anderen Biomolekülen aufgeführt sind. Die systematische Suche nach putativ aktivierten Kinasen ergab eine Anzahl von 54 potentiell aktivierten Kinasen in MCF7 und 53 in Caco-2 Zellen. 25 Kinasen waren in den Listen beider Zelllinien vorhanden (Tabelle 4.2)

Beispielhaft ist in Abbildung 4.11 ein Ausschnitt der mit Pathway Assist angelegten Interaktionskarte des Kinoms mit den in MCF7 Zellen hochregulierten Phosphoproteinen (blau umrandet) dargestellt. Die Suche nach Interaktionspartnern der Phosphoproteine mit dem Kinom zeigt, dass z.B. die Proteine EVL (Ena/VASP-like protein), Abl Interactor 1 (SSH3BP1) und PRKD2 mit der Tyrosin-Kinase Abl1 interagieren. Es ist also wahrscheinlich, dass Abl1 nach Internalin A Stimulation in MCF7 Zellen aktiviert wurde. Gleiches gilt für die Kinase Pak1, da ebenfalls 3 Interaktionspartner von Pak1 (SSH3BP1, CtBP2 und OXSR1) nach Stimulation phosphoryliert wurden.

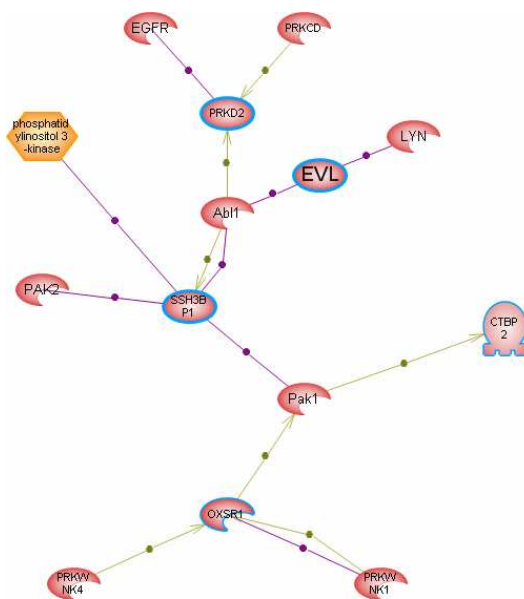


Abbildung 4.11 Interaktionen von Kinasen mit in MCF7 Zellen hochregulierten Phosphoproteinen nach Internalin A Stimulation Blau umrandete Proteine wurden in MCF7 Zellen nach Stimulation mit Internalin A mit höherer Abundanz detektiert als in unbehandelten Zellen. Grüne Pfeile zeigen aus der Literatur bekannte Phosphorylierungsreaktionen (grüne Pfeile) zwischen Kinase (sichelförmig) und Substrat (oval), während Bindungen zwischen zwei Proteinen durch violette Markierungen dargestellt sind.

Durch die Identifikation der Kinasen, welche die als phosphoryliert gefundenen Substrate phosphorylieren, lassen sich Hypothesen zur Aktivierung von Kinasen und Signalwegen, welche nach einer Stimulation durch Internalin A in der Zelle aktiviert wurden, aufstellen. Im in Abbildung 4.11 dargestellten Netzwerk erscheinen die Kinasen Abl1 und Pak1 als potentiell aktiv.

Tabelle 4.2 Nach Internalin A Stimulation in Caco2 und MCF7 Zellen potentiell aktive Kinasen

Mit Pathway Studio 5.0 (Ariadne Genomics) wurde nach Kinasen gesucht, die mit den nach Internalin A Stimulation als differentiell phosphorylierten Proteinen identifizierten Proteinen interagieren. Aufgelistet wurden solche Kinasen, welche in beiden Zelllinien potentiell aktiv waren.

Sprot ID	Name	Funktion
P00533	EGFR	Rezeptor-Tyrosin Kinase, Proliferation und Differenzierung von Zellen
O75100	CDK2	Serin/Threonin Kinase, Zell-Zyklus
P31749	AKT1	Serin/Threonin Kinase, Teil des EGFR und PI(3)K Signalweges
P27361	MAPK3	Serin/Threonin Kinase, Proliferation
P28482	MAPK1	Serin/Threonin Kinase, Proliferation
P45983	MAPK8	Serin/Threonin Kinase, Stressantwort
Q05655	PRKCD	Serin/Threonin Kinase, Rezeptor für Phorbolester
P06493	CDC2	Serin/Threonin Kinase, Zell-Zyklus
P12931	SRC	Tyrosin Kinase, Multiple Funktionen
P00519	Abl1	Tyrosin Kinase, Modellierung des Zytoskeletts
P12956	G22P1	DNA Reparatur, Teil des DNA-PK Komplexes
P07948	LYN	Tyrosin Kinase, Multiple Funktionen
Q13315	ATM	Serin/Threonin Kinase, Apoptose, Zell-Zyklus, Vesikel Transport
Q13387	MAPK8IP2	MAPK8 bindendes Protein
O75561	Pak1	Serin/Threonin Kinase, Beteiligt an Rho, MAPK, Rac1 und CDC42 Signalwegen
P50750	CDK9	Serin/Threonin Kinase, Zell-Zyklus
O00141	SGK	Serin/Threonin Kinase, Stressantwort
P49841	GSK3B	Serin/Threonin Kinase, multiple Funktionen
P41743	PRKCI	Serin/Threonin Kinase, Polarisation von Zellen, Zell-Zell-Kontakte
Q96J92	PRKWINK4	Serin/Threonin Kinase, Regulation von Ionen Transportsystemen
Q4VBX9	PRKWINK1	Serin/Threonin Kinase
O95747	OXSRI	Serin/Threonin Kinase, Stressantwort
Q14680	MELK	Serin/Threonin Kinase, Regulation des Splicosomes
Q13523	PRPF4B	Serin/Threonin Kinase, pre-mRNS Prozessierung
Q9H3Y6	SRMS	Tyrosin Kinase, Proliferation und Differenzierung von Zellen

Tabelle 4.2 listet die Kinasen auf, welche aufgrund der identifizierten differentiellen Phosphorylierungen auf Substratebene nach Stimulation von MCF7 und Caco-2

Zellen durch Internalin A, als potentiell aktiviert vorhergesagt wurden. Pak1 und Abl1 wurden nicht nur in MCF7 Zellen nach Internalin A Stimulation als aktiviert vorhergesagt, sondern auch in Caco-2 Zellen. Gleiches gilt für andere prominente Kinasen wie Src oder EGFR. Die aufgelisteten Kinasen sind also möglicherweise an der Zellantwort auf eine Bindung von Internalin A an E-cadherin oder einen anderen noch unbekannten Bindungspartner beteiligt. Da die hier beschriebene Vorgehensweise zur Identifikation potentiell aktiver Kinasen ein indirektes Verfahren ist, empfiehlt sich eine Validierung der 25 Kinasen aus Tabelle 4.2 durch herkömmliche Methoden wie Immunopräzipitation mit anschließendem phosphospezifischem Immunoblot.

4.3 Untersuchungen zu Internalin A abhängigen Endozytose von *Listeria monocytogenes*

Die schnelle Endozytose von *Listeria monocytogenes* in nicht professionell phagozytierende Zellen ist für eine Infektion von elementarer Bedeutung. Nur die effektive Aufnahme in Wirtszellen schützt *Listeria* vor einer extrazellulären Erkennung durch die humorale Immunabwehr. Der erste Schritt ist dabei die Bindung des Bakterium an die zu infizierende Zelle durch Oberflächenproteine. Dabei wird die Bindung im wesentlichen durch die Proteine Internalin A und Internalin B ermöglicht, welche an E-cadherin bzw. c-Met binden. Während die Bindung von Internalin B zu einer Aktivierung des c-Met-Signalweges führt, sind die zellulären Ereignisse, die sich aus der Bindung von Internalin A ergeben, bisher nur wenig charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass Internalin A für die Induzierung einer Aufnahme von entsprechend beschichteten Latex-Kügelchen (Lecuit et al., 1997) ausreicht, was den Schluss nahe legt, dass Internalin A nicht nur für die Bindung des Bakteriums an die Wirtszelle nötig ist, sondern auch bisher uncharakterisierte Signalwege stimuliert. Andererseits könnte eine Internalin A vermittelte Aufnahme von *Listeria* auf den für die Proteinsortierung von E-cadherin beruhenden zellulären Prozessen gründen. Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, welche zellulären Ereignisse durch die Bindung von Internalin A an E-cadherin ausgelöst werden und

welchen Einfluss Degradationsprozesse auf die Effektivität der Infektion von menschlichen Zellen durch *Listeria monocytogenes* haben.

4.3.1 Inhibition der lysosomalen und proteosomalen Proteindegradation durch MG132

Das organische Molekül MG132 (Abb. 4.12) inhibiert die Degradation von ubiquitinierten Proteinen durch das Proteasom. Dadurch reichern sich ubiquitinierte Proteine in der Zelle an, was nach wenigen Stunden fatale Folgen für die behandelte Zelle hat. MG132 kann die Zellwand durchdringen und hat einen IC_{50} -Wert von $3\mu M$.

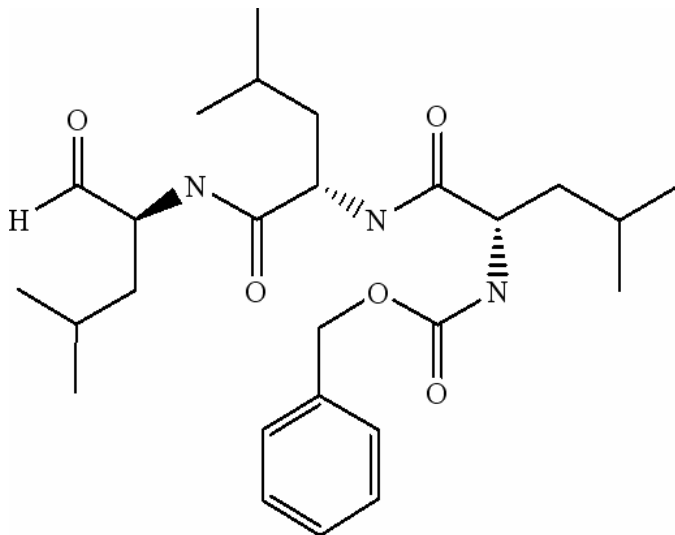


Abb. 4.12 Chemische Struktur des Proteasom-Inhibitors MG132 Der Peptid-Aldehyd MG132 (Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal) ist ein selektiver ($K_i = 4nM$) Inhibitor des 26S-Proteasomes. MG132 kompetiert mit ubiquitinierten Proteinen um die Bindung an das Proteasom. Die Bindung ist reversibel.

Obwohl MG132 keinen direkten inhibierenden Effekt auf die Aktivität des Lysosomes hat, konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von Zellen mit MG132 zu einer verminderten Aktivierung des c-Met-Signalweges führt (Tsukamoto et al., 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des Proteasomes durch MG132 zu einer Reduktion des E-cadherin Umsatzes und damit zu einer Verlängerung der Halbwertszeit von E-cadherin an der Membran führt. Die verlängerte Halbwertszeit konnte selbst bei HGF-Stimulation, welche in unbehandelten Zellen zu einer Endocytose von E-cadherin führt, oder bei einer Temperatur-induzierten Aktivierung von v-Src in entsprechend transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Eine andere Studie (Yang et al., 2006) konnte zeigen, dass die E3 Ubiquitin Ligase MDM2 Poly-Ubiquitin an E-cadherin synthetisiert. Während Poly-Ubiquitin-Reste allgemein als

Degradationssignal für zelluläre Proteine angesehen werden, werden Membranproteine in der Regel mono-ubiquitiniert und damit die Endozytose eingeleitet. Im Falle von E-cadherin konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des Proteasomes durch MG132 die MDM2 vermittelte Degradation von E-cadherin verhindert.

Für eine Untersuchung des Effektes von MG132 auf die Infektionsrate von *Listeria monocytogenes* (4.3.2) wurde die Anreicherung von ubiquitinierten Proteinen in MCF-7 Zellen analysiert. Dazu wurde MG132 in einer Konzentration von 5 μ M für 5 Stunden in Minimal-Medium gegeben. Die Detektion ubiquitinierten Proteine (Abb. 4.13) erfolgte durch das Western-Blot-Verfahren (Burnette, 1981).

Detektion: Ubiquitin
-MG132 +MG132

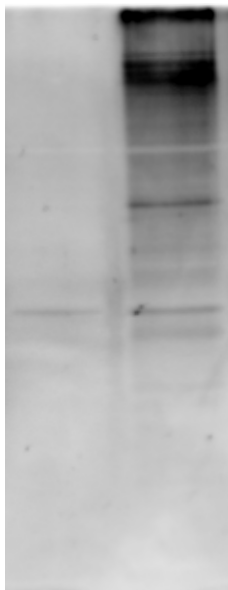


Abb 4.13 Zelluläre Anreicherung von ubiquitinierten Proteinen nach MG132

Behandlung MCF7-Zellen wurden für 5 Stunden mit 5 μ M MG132 inkubiert. Ubiquitinierte Proteine wurden mittels Western Blot nach SDS-Page detektiert. Während in unbehandelten Zellen kaum ubiquitinierte Proteine zu erkennen sind, ist der Gehalt ubiquitinierten Proteine nach MG132 um den Faktor 35 erhöht.

Durch die Inhibition des Proteasomes, wurden ubiquitinierte Proteine nicht mehr degradiert und reicherten sich in den Zellen an. Dieses Experiment schuf die Grundlage für eine Analyse, welche der Frage nachgeht, inwiefern eine funktionierende proteasomale Degradation von Proteinen in Zellen für die Infektion und insbesondere für den Prozess der Invasion durch *Listeria monocytogenes* notwendig ist.

4.3.2 Der Einfluss von MG132 auf die Infektionseffizienz von *Listeria monocytogenes*

Zur Untersuchung der Relevanz des Proteasomes bei der Endozytose von *Listeria monocytogenes* wurden MG132 behandelte Zellen nach 3.3.9 mit Listerien infiziert. Dabei wurden zum einen Listerien des Wildtyps verwendet, zum anderen wurden Deletionsmutanten der Gene *internalin A* und *internalin B* verwendet.

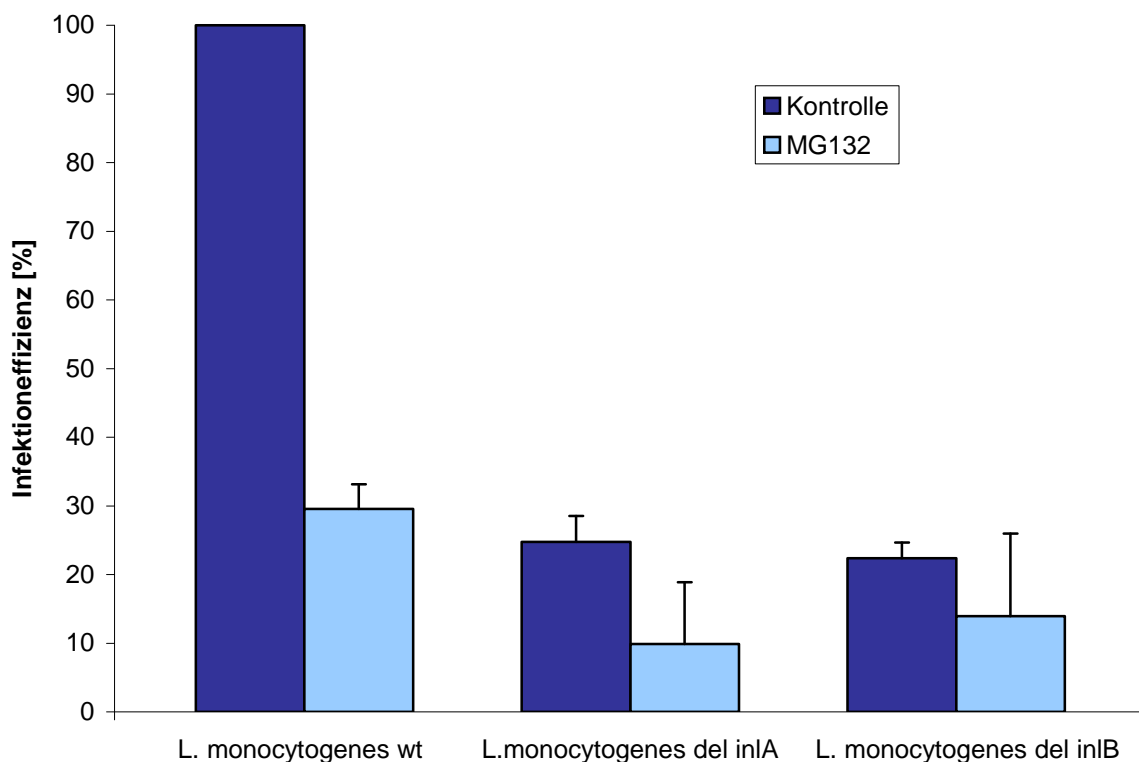


Abb. 4.14 Effekt von MG132 auf die Infektion durch *Listeria monocytogenes* MCF7-Zellen wurden 5 Stunden mit MG132 inkubiert und für 30 Minuten mit Listerien infiziert. Die Infektion mit Listerien des Wildtyps zeigt eine deutliche Reduktion der Infektionseffizienz nach MG132 Behandlung. Eine weitere Reduktion ist zu beobachten, wenn den Bakterien die Proteine Internalin A und Internalin B fehlen.

Abbildung 4.14 zeigt die durch den „Gentamicin Protection Assay“ (Elsinghorst et al., 1994) ermittelte Infektionseffizienz der drei verwendeten *Listeria*-Stämme mit und ohne MG132-Behandlung. MG132 reduzierte die Aufnahme von *Listeria* Wildtyp in MCF7 Zellen auf unter 30% des Ausgangswertes. Um eine Analyse der initialen Invasionsprozesse zu ermöglichen, wurden die Zellen 30 Minuten mit Listerien inkubiert, bevor extrazelluläre Bakterien abgetötet wurden. Somit lässt sich aus der reduzierten Infektionseffizienz der Listerien des Wildtyp-Stammes erkennen, dass die

Behandlung der Zellen mit MG132 und damit die Inhibition des Proteasomes einen dramatischen Effekt gerade auf die frühen Prozesse der Invasion haben.

Fehlt den Listerien das bakterielle Adhäsionsprotein Internalin A, ist die Bindungsstärke der Bakterien zu den Zellen herabgesetzt, was sich in einer reduzierten Aufnahme der Bakterien in die Wirtszellen auswirkt. Zeitgleich steht den Bakterien neben anderer weniger gut charakterisierten Faktoren nur noch Internalin B zur Induktion des Aufnahmeprozesses zur Verfügung. Die Internalin B abhängige Infektionseffizienz von Listerien in MCF7-Zellen lässt sich somit auf 24,7% der Effizienz des Wildtyps beziffern. Nach MG132-Behandlung reduziert sich die Endozytose auf unter 10% des Ausgangswertes. Die Aktivität des Proteasomes ist demnach auch für die Internalin B abhängige Endozytose von *Listeria monocytogenes* notwendig.

Im Falle der Internalin B-Deletionsmutante können die Bakterien zwar an die Wirtszelle binden, aber nicht den c-Met-Signalweg über Internalin B aktivieren. Dennoch befindet sich die Internalin A abhängige Infektionseffizienz von *Listeria* auf demselben Niveau wie die von Internalin B. Die Inhibition des Proteasomes bewirkt auch hier eine weitere signifikante Reduktion der Infektionseffizienz, so dass von einer Beteiligung des Proteasomes an den Invasionsprozessen von *Listeria monocytogenes* ausgegangen werden muss.

4.3.3 Ermittlung der c-SRC abhängigen Phosphorylierungsstelle im p120 catenin Interaktionsbereich von E-cadherin

Die Bindung des Proteins p120 an E-cadherin ist für die Stabilität des E-cadherin-Komplexes von entscheidender Bedeutung. Dissoziiert p120 aus dem Komplex wird E-cadherin ubiquitiniert, was zu einer Endozytose und teilweisen Degradation des Komplexes führt. Fujita et al. (2002) konnten zeigen, dass die Phosphorylierung von E-cadherin N-terminal von der p120-Bindungsstelle zu Abspaltung von p120 aus dem E-cadherin führt (Abb. 4.15).

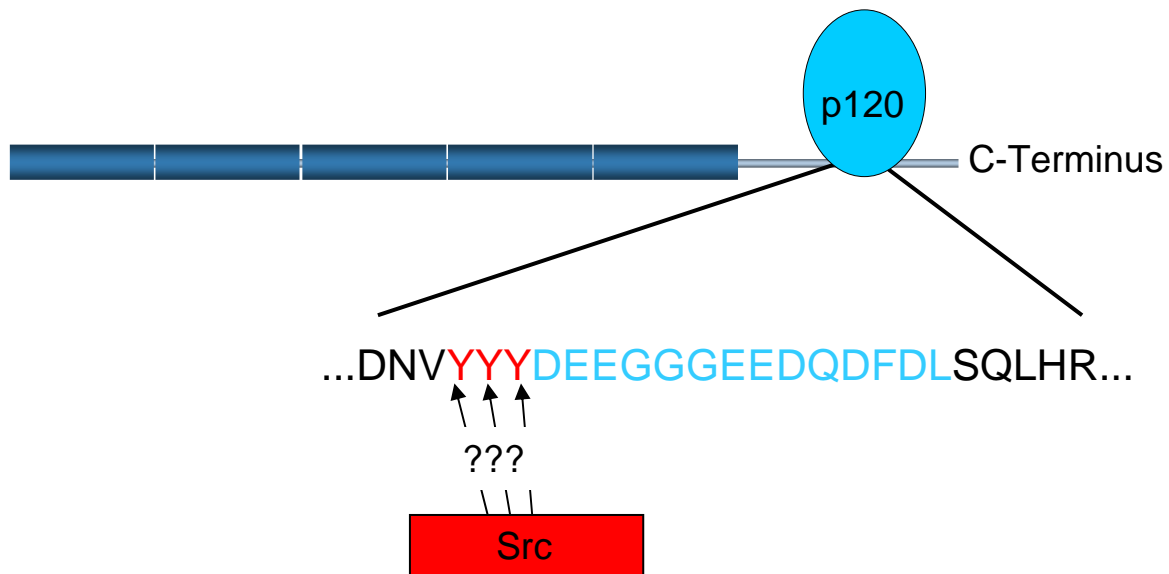


Abb. 4.15 Der p120 catenin Bindungsbereich von E-cadherin Im intrazellulären, membrannahen Bereich von E-cadherin bindet das Protein p120 catenin. Die Präsenz von p120 im E-cadherin Komplex ist für seine Stabilität von entscheidender Bedeutung. Wird E-cadherin N-terminal von der p120 Bindungsstelle phosphoryliert, führt dies zu einer Dissoziation von p120 und der Rekrutierung von Hakai. Welches der drei in Frage kommenden Tyrosine phosphoryliert wird, ist nicht bekannt. Eine mögliche Kinase ist Src.

Die Phosphorylierung konnte mittels HGF-Stimulation oder der Aktivierung einer transfizierten v-Src Kinase induziert werden. N-Terminal der p120-Bindungsstelle liegen drei Tyrosine, von denen Tyrosin 753 oder 754 durch Mutagenese als diejenigen identifiziert wurden, welche für die Induktion einer p120 Abspaltung phosphoryliert werden könnten. Zum besseren Verständnis der Endozytose von E-cadherin sollte die genaue Position des Tyrosins ermittelt werden, welches durch Src phosphoryliert werden kann. Im folgenden sollte dieses Wissen zur Generierung eines phosphospezifischen Antikörpers genutzt werden, durch welchen untersucht werden könnte, ob die Stimulation von Zellen mit Internalin A tatsächlich zu einer Phosphorylierung von E-cadherin führt.

Dazu wurde ein Peptid synthetisiert, welches die p120 Bindungsstelle, die drei Tyrosine und die drei Aminosäuren N-terminal davon enthält. Das Peptid wurde mit rekombinant hergestellter c-Src Kinase und ATP inkubiert. Nach der Phosphorylierungsreaktion wurde das Peptid massenspektrometrisch am Q-Tof2 (micromass, Manchester) vermessen um die Phosphorylierungsstelle zu ermitteln.

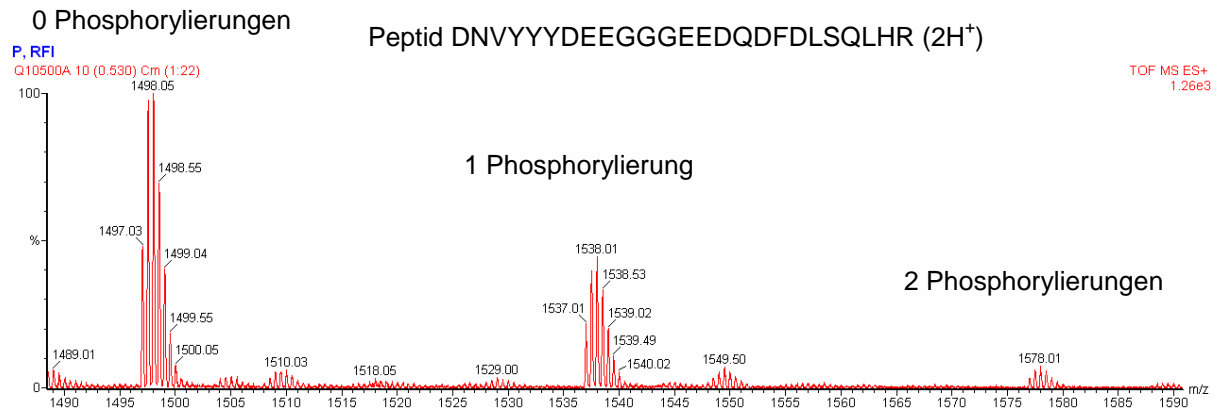
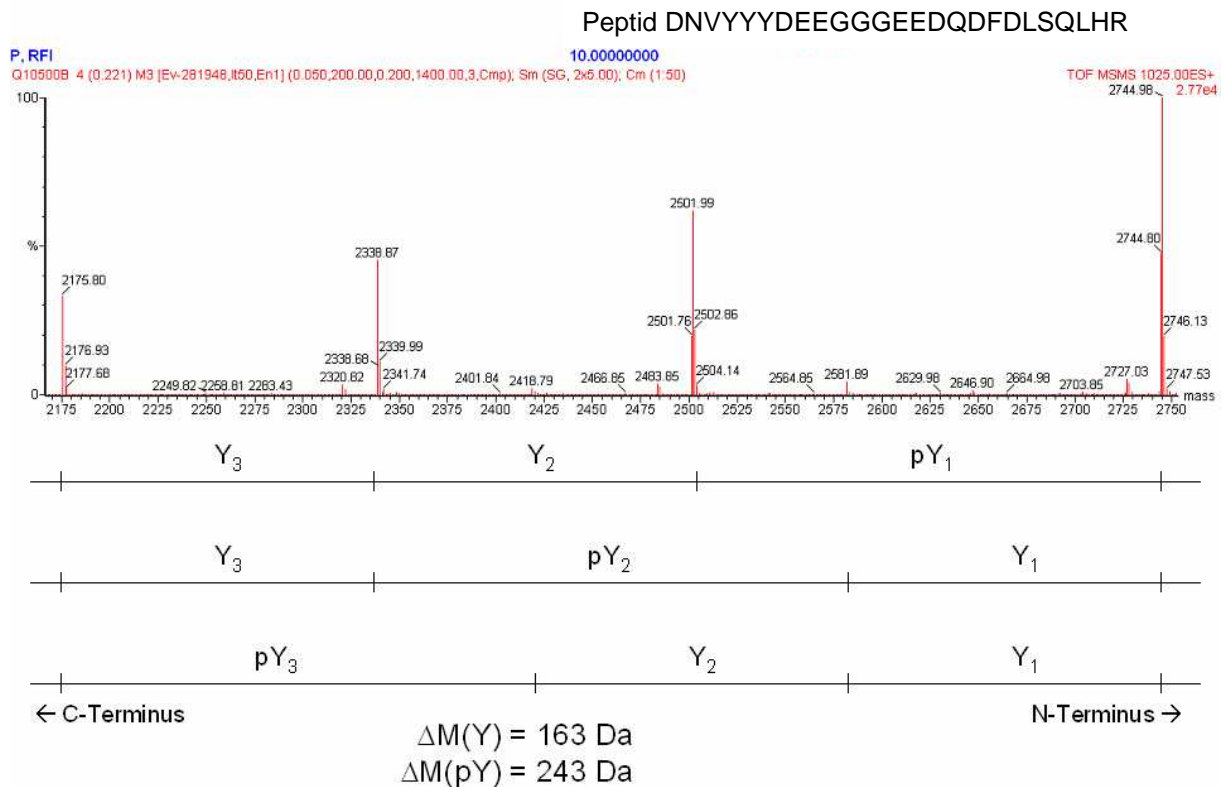


Abb. 4.16 Phosphorylierung des Peptids DNVYYYDEEGGGEEDQDFDLSQLHR durch rekombinante c-Src Kinase Das zur Bindungsregion von p120 catenin korrespondierende Peptid wurde synthetisiert, mit rekombinanter c-Src Kinase phosphoryliert und massenspektrometrisch analysiert. Das Spektrum zeigt das zweifach geladene und unphosphorylierte Peptid bei 1497 Dalton, das einfach phosphorylierte Peptid bei 1537 und das zweifach phosphorylierte Peptid bei 1577 Dalton.

Abbildung 4.16 zeigt den Erfolg der Phosphorylierungsreaktion. Das unphosphorylierte Peptid hat eine Masse von 2994 Da und lässt sich aufgrund der zweifachen Ladung bei 1497,03 Da detektieren. Wird das Peptid phosphoryliert, erhöht sich seine Masse um 80 Da und ist bei 1537,01 Da zu detektieren. Eine weitere Phosphorylierung erhöht seine Masse um weitere 80 Da. Die Signalintensitäten in dem gezeigten Spektrum lassen sich für eine Quantifizierung der drei Peptidspezies nicht nutzen, da phosphorylierte Peptide sich in Gegenwart von nicht-phosphorylierten Peptiden schlechter ionisieren lassen (Ionensuppression). Eine LC-MS/MS-Analyse des Peptidgemisches, welche phosphorylierte und nicht-phosphorylierte Peptide trennt, zeigte eine Signalintensität von 22% für das monophosphorylierte Peptid im Vergleich zum nicht-phosphorylierten Peptid. Die dreifach phosphorylierte Peptidspezies konnte in keiner Analyse nachgewiesen werden. Zur Identifizierung der Phosphorylierungsstelle wurde vom einfach phosphorylierten Peptid ein Fragmentspektrum erstellt (Abb. 4.17).



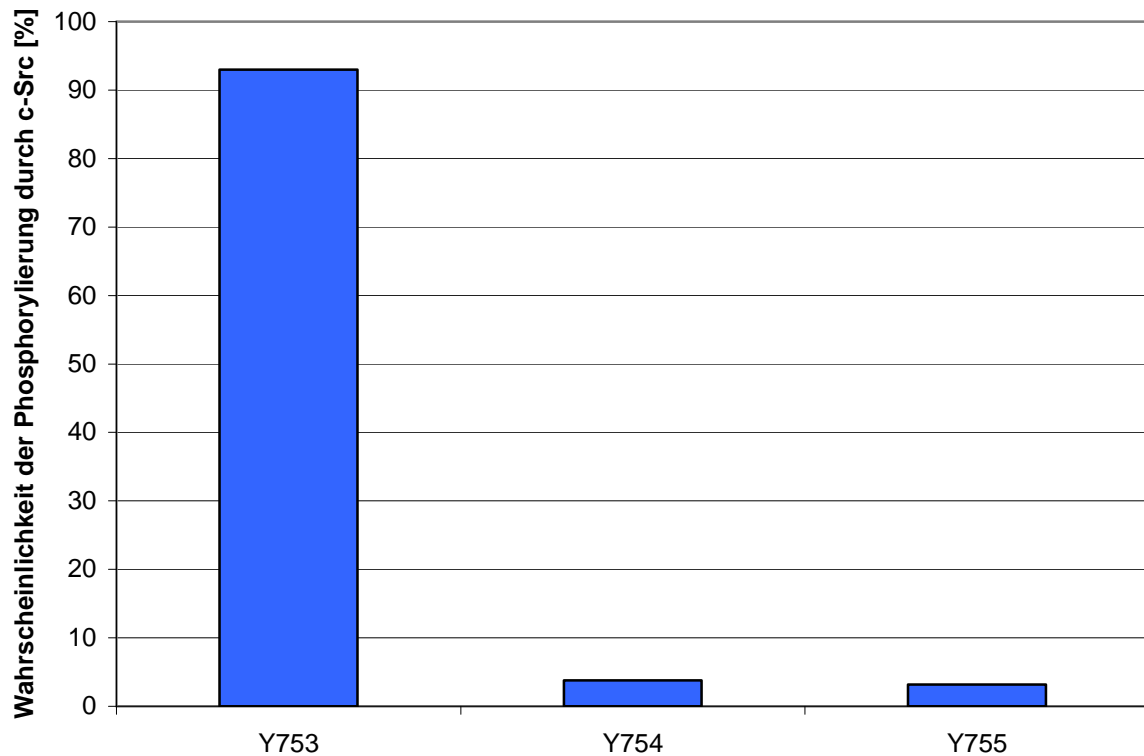


Abb. 4.18 c-Src phosphoryliert E-cadherin an Y753 Anhand der Signalintensitäten der Phosphorylierungsstelle-spezifischen Signale im Fragmentspektrum (Abb. 4.17) wurden die Anteile jeder phosphorylierten Peptidspezies in der Probe ermittelt. c-Src phosphoryliert E-cadherin bevorzugt an Y753 (92,9%). Die Häufigkeiten von Y754 und Y755 liegen bei 3,8 bzw. 3,2%.

Setzt man erneut voraus, dass der Ort der Phosphorylierung keinen Einfluss auf die Ionisierung des Peptides und seiner Fragmente hat, lässt sich am Verhältnis der Signalintensitäten bei 2419, 2502 und 2582 Da ein Verhältnis von 29,3 : 1,2 : 1 (Y753 : Y754 : Y755) der monophosphorylierten Peptide zueinander im Analyten ermitteln (Abb 4.18). Y753 wurde in 92,9% der Phosphorylierungsreaktionen durch c-Src phosphoryliert und ist damit die wahrscheinlichste Phosphorylierungsstelle von c-Src im untersuchten Bereich von E-cadherin.

Gegen die ermittelte Phosphorylierungsstelle an Y753 in E-cadherin wurde in Zusammenarbeit mit Christian Erk (HZI Braunschweig, Zellbiologie) ein monoklonaler Antikörper generiert (3.5.1). Zur Ermittlung, ob c-Src auch das Volllänge E-cadherin phosphorylieren kann, wurde eine Immunopräzipitation von E-cadherin mit einem intrazellulär bindenden Antikörper durchgeführt und das Präzipitat mit rekombinanter c-Src Kinase und ATP inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Immunodetektion mit den

phosphospezifischen Antikörpern A, B und C (Hybridoma-Klone, siehe 3.5.1) analysiert.

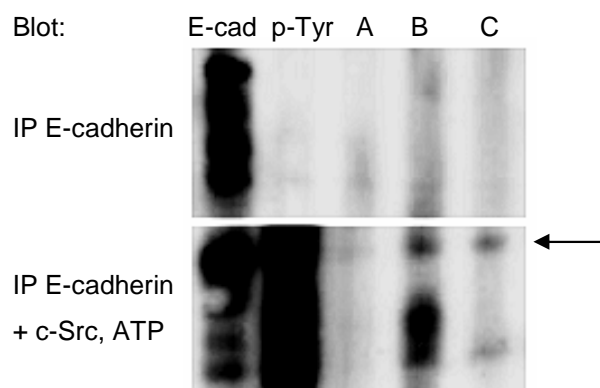


Abb. 4.19 Nachweis der Phosphorylierung von Y753 in funktionellem Volllänge E-cadherin Aus einem MCF7 Zelllysate wurde E-cadherin immunopräzipitiert und mit rekombinanter c-Src Kinase + ATP inkubiert. Der Western Blot mit verschiedenen Antikörpern zeigt eine Phosphorylierung von E-cadherin (Anti pTyr) und eine Phosphorylierung von E-cadherin an Y753 (Klon B (c61) und C (c62), Pfeil).

Abbildung 4.19 zeigt die Detektion von an Y753 phosphoryliertem E-cadherin mittels Immunodetektion. Zur Kontrolle wurde ein nicht phosphoryliertes Immunopräzipitat aufgetragen und Antikörper gegen E-cadherin und Phospho-Tyrosin zur Detektion verwendet. Die Klone B und C der generierten Phospho-E-cadherin Antikörper zeigten ein Signal im für E-cadherin erwarteten Massenbereich beim phosphorylierten Immunopräzipitat, während in der nicht-phosphorylierten Kontrolle kein Signal detektiert wurde. Zur weiteren Verifikation einer Phosphorylierung von E-cadherin durch c-Src wurde ein Immunopräzipitat von E-cadherin mit einem extrazellulär bindenden Antikörper durchgeführt und als Antikörper Subklone von B und C in einer ELISA-Analyse eingesetzt.

Tabelle 4.3 ELISA-Analyse der Phosphorylierung von immunopräzipitierten E-cadherin nach Phosphorylierung durch c-Src Mittels Immunopräzipitation wurde E-cadherin aus einem MCF7 Zelllysate angereichert und durch rekombinante c-Src Kinase phosphoryliert bzw. ohne Src inkubiert. Der phosphospezifische Antikörper gegen pY753 E-cadherin B sub zeigt eine positive Reaktion auf die Kinase-Behandlung.

Antikörper	SRC +	SRC +	SRC -	SRC -
B sub	0.764	0.754	0.095	0.124
C sub	0.059	0.057	0.058	0.052
ECad AK	1.307	1.243	0.631	0.681
Phos Tyr AK	1.803	1.821	0.073	0.074

Tabelle 4.3 zeigt die ELISA-Analyse in Doppelbestimmung. Getestet wurden Immunopräzipitate mit und ohne Kinase-Behandlung. Der E-cadherin Antikörper zeigte eine positive Anreicherung von E-cadherin in der Immunopräzipitation. Das Signal in der Kinase-freien Kontrolle war dabei etwa 50% schwächer als in der Src behandelten Probe. Das Signal, welches der Phospho-Tyrosin Antikörper erzeugte, zeigte die Aktivität von c-Src unter den gewählten Versuchsbedingungen. Die Antikörper-Varianten B sub und C sub zeigten verschiedene Reaktionen. Der Antikörper B sub erzeugt ein um den Faktor 6 – 8 stärkeres Signal in der Kinase-behandelten Probe, während der Antikörper mit der Bezeichnung C sub ein geringes, unspezifisches Signal erzeugte. Die Analysen von c-Src behandeltem Immunopräzipitat von E-cadherin im Western Blot und ELISA belegen, dass c-Src nicht nur ein zu E-cadherin korrespondierendes Peptid, sondern auch aus Zelllysaten extrahiertes, funktionelles E-cadherin an Y753 phosphorylieren kann.

4.3.4 InIA induzierte Endozytose von E-cadherin

Lecuit et al. (1997) konnte zeigen, dass Internalin A beschichtete Latex-Kügelchen in nicht professionell phagozytierende Zellen aufgenommen werden. Inwiefern aufgereinigtes Internalin A eine Endozytose des E-cadherin Komplexes einleitet, sollte mit einem „Trypsin-Protection-Assay“ ermittelt werden. Bei diesem Assay inkubiert man die Zellen mit Trypsin, was zu einem proteolytischen Abbau von Membran- und extrazellulären Proteinen führt. Wird ein Protein endozytiert, ist es vor dem Verdau durch Trypsin geschützt. Zur Detektion von E-cadherin wurde ein Antikörper, welcher an der intrazellulären Domäne - und einer welcher an der extrazellulären Domäne bindet, verwendet. Zur Bestimmung der Inkubationszeit mit Trypsin, die zu einer signifikanten Reduktion von Volllänge E-cadherin führt, wurden Caco-2 Zellen für 1, 3 und 5 Minuten mit Trypsin inkubiert und die intrazelluläre Domäne mittels Immunoblot detektiert (Abb. 4.20).

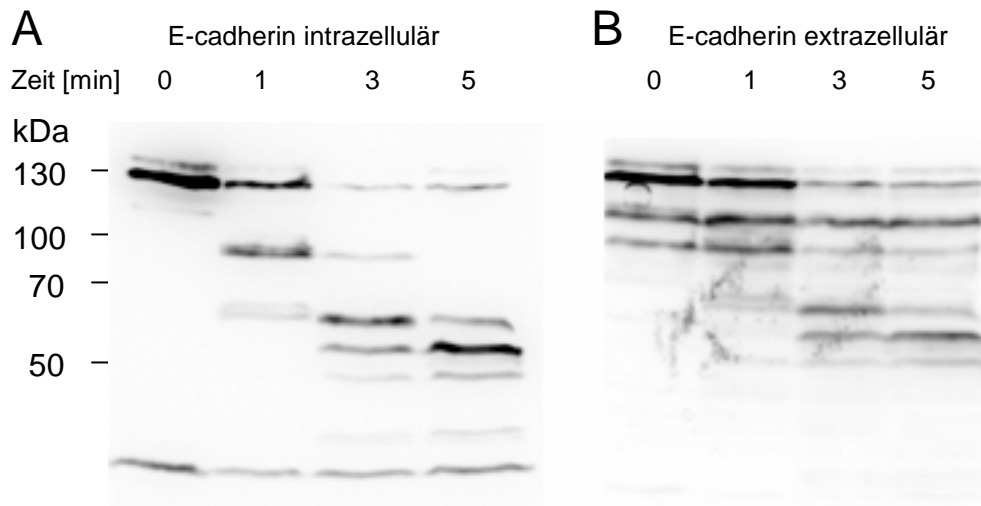


Abb. 4.20 Proteolytischer Abbau von E-cadherin Caco-2 Zellen wurden 1, 3 und 5 Minuten mit Trypsin bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von DMEM + FCS gestoppt und Zelllysate durch SDS-Page und Western Blot analysiert. **A)** Detektion von E-cadherin durch einen Antikörper, welcher an die intrazelluläre Domäne von E-cadherin bindet. **B)** Detektion durch einen Antikörper, welcher an die extrazelluläre Domäne bindet.

In der unbehandelten Kontrolle erkennt der intrazellulär bindende Antikörper prozessiertes E-cadherin bei <130 kDa und eine Vorläufer E-cadherin Bande bei >130 kDa. Nach einer Minute Trypsinbehandlung hat die Intensität der E-cadherin Bande signifikant abgenommen, während bei etwa 90 und 60 kDa neue Banden erkennbar sind. Diese Fragmente müssen die intrazelluläre Domäne von E-cadherin beinhalten, so dass man davon ausgehen kann, dass E-cadherin durch Trypsin beginnend am N-Terminus abgebaut wird. Nach 3 Minuten werden nur noch etwa 5% der ursprünglichen Volllänge E-cadherin Menge detektiert. Nach weiteren 2 Minuten verändert sich die Menge an intaktem E-cadherin nicht mehr. Somit erscheint eine Inkubationsdauer von 3 Minuten mit Trypsin als ideal.

Zur Untersuchung, ob eine Stimulation mit Internalin A zu einer Endozytose von E-cadherin führt, wurden Caco2-Zellen für 5 Minuten stimuliert und nach 3.3.8 weiterbehandelt. Aus den Verdau-Überständen wurden die Proteine nach 3.4.1 extrahiert. Lysate und Überstände wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und eine Immunodetektion mit Antikörpern gegen die intra- und extrazelluläre Domäne von E-cadherin durchgeführt.

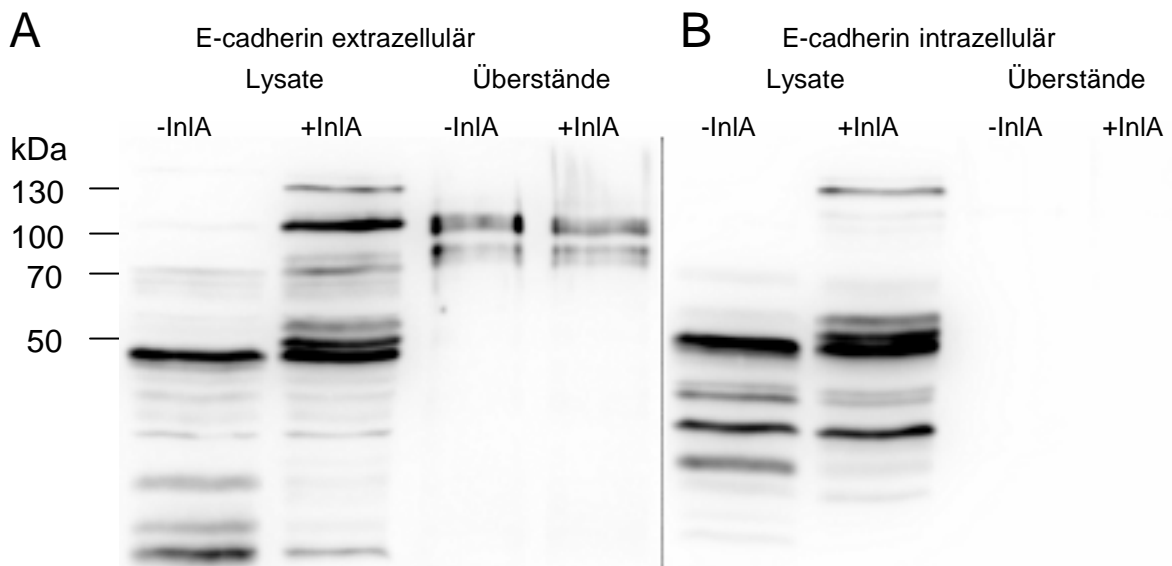


Abb. 4.21 Endozytose von E-cadherin nach Internalin A Stimulation Caco2-Zellen wurden für 5 Minuten mit Internalin A stimuliert und anschließend für 3 Minuten mit Trypsin inkubiert und pelletiert. Zelllysate wurden durch SDS-Page und Western Blot analysiert. Aus den Trypsin-Überständen wurden die Proteine extrahiert und ebenfalls aufgetragen. **A)** Detektion mit dem extrazellulär bindenden Antikörper gegen E-cadherin. **B)** Detektion mit dem intrazellulär bindenden Antikörper gegen E-cadherin.

Abbildung 4.21 zeigt die Immunodetektion von E-cadherin Fragmenten mit und ohne Stimulation durch Internalin A. Der gegen die extrazelluläre Domäne gerichtete E-cadherin Antikörper (A) detektiert im Kontroll-Lysat ausschließlich fragmentiertes E-cadherin mit Molekülmassen von <70 kDa. Bei stimulierten Zellen lässt sich neben einer Volllänge E-cadherin Bande bei 130 kDa eine weitere Bande bei 100 kDa erkennen. In beiden Überständen lassen sich Banden bei 100 kDa erkennen, wobei die der stimulierten Zellen schwächer erscheint. Dabei handelt es sich um die extrazelluläre Domäne von E-cadherin, welche in B durch den intrazellulär bindenden Antikörper nicht detektierbar ist. In nicht-stimulierten Zellen ist E-cadherin in Adhäsionskomplexen gebunden und die extrazelluläre Domäne für einen enzymatischen Verdau durch Trypsin zugänglich. Die 3-minütige Trypsinbehandlung führt zu einem nahezu vollständigen Verdau des Volllänge-Proteins. Nach einer Stimulation der Zellen mit Internalin A und anschließender Trypsinbehandlung ist das Volllänge-Protein noch nachweisbar. Demnach ist E-cadherin 5 Minuten nach der Stimulation durch Internalin A vor einer proteolytischen Spaltung geschützt, was auf eine Endozytose des Proteins schließen lässt. Bei der Detektion des intrazellulären

Motifs von E-cadherin zeigt sich ein ähnliches Bandenmuster. Volllänge E-cadherin ist nur bei stimulierten Zellen zu erkennen. Die 100 kDa Bande wurde nicht detektiert.

4.3.5 InlA induzierte Phosphorylierung von Komponenten des E-cadherin-Komplexes

Als zelluläre Antwort auf die Bindung von Internalin A an die extrazelluläre Domäne von E-cadherin ließen sich im Falle der Einleitung der Endozytose von E-cadherin Phosphorylierungen an Komponenten des E-cadherin Komplexes erwarten. Der in 1.2.2 geschilderte Verlauf der Clathrin-vermittelten Endozytose von E-cadherin bedingt eine Phosphorylierung von E-cadherin selbst an der in 4.3.3 ermittelten Phosphorylierungsstelle und von β -catenin. In den folgenden Untersuchungen wurden Zellen mit rekombinantem Internalin A nach 3.3.5 stimuliert und mittels phosphospezifischer Antikörper eine Veränderung im Phosphorylierungsmuster in Abhängigkeit der Stimulationsdauer detektiert.

Phosphorylierung von β -catenin an S45

Frei im Zytosol vorkommendes β -catenin wird durch Casein-Kinase an Serin 45 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung dient als Erkennungsmotif für die Kinase GSK3 β , welche weitere Phosphorylierungen an S33 und S37 in β -catenin durchführt. Das so modifizierte Protein bindet an die Ubiquitin Ligase β Trcp, wird ubiquitiniert und durch das 26S-Proteasom abgebaut. Da β -catenin im Falle der Destabilisierung des E-cadherin-Komplexes aus dem Proteinverbund herausgelöst wird, kann es im Zytosol an Serin 45 phosphoryliert werden. Löst die Bindung von Internalin A an E-cadherin eine Endozytose und damit eine Destabilisierung des Komplexes aus, ist eine zeitliche Veränderung des Phosphorylierungsmusters von β -catenin zu erwarten.

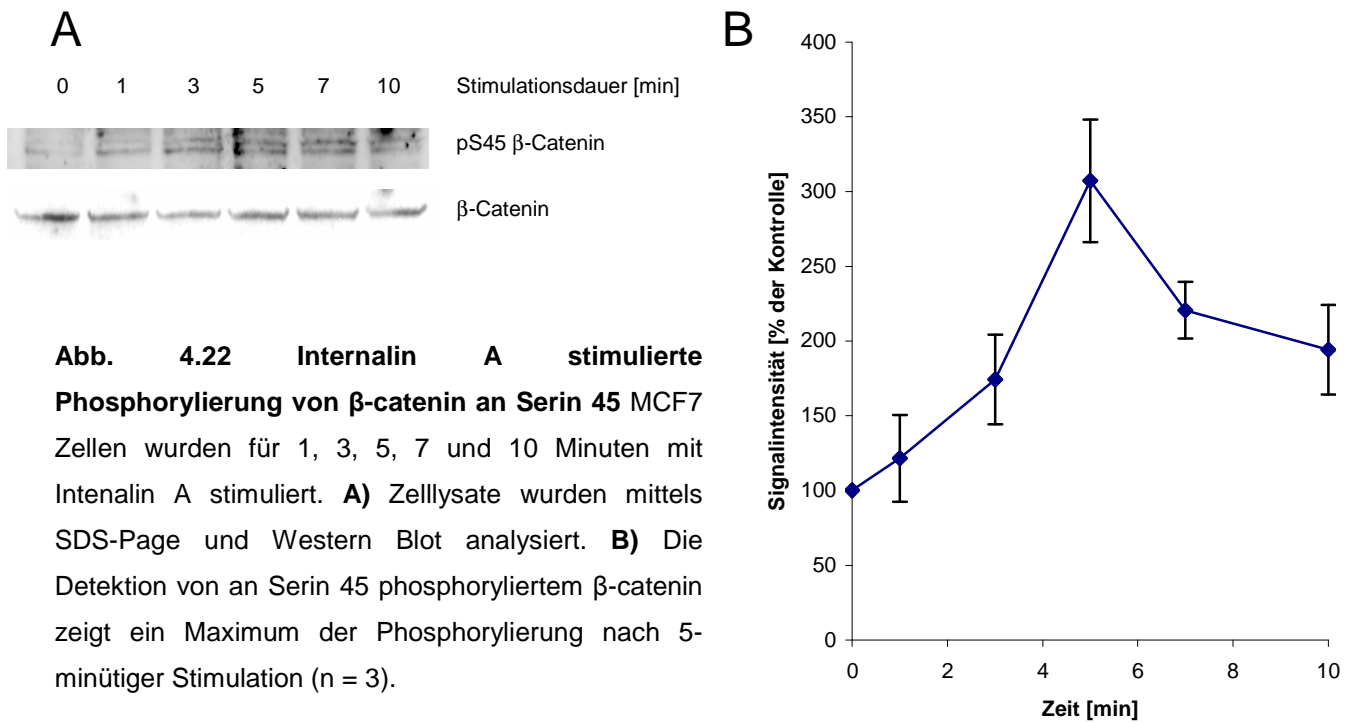


Abb. 4.22 Internalin A stimulierte Phosphorylierung von β -catenin an Serin 45 MCF7 Zellen wurden für 1, 3, 5, 7 und 10 Minuten mit Internalin A stimuliert. **A)** Zelllysate wurden mittels SDS-Page und Western Blot analysiert. **B)** Die Detektion von an Serin 45 phosphoryliertem β -catenin zeigt ein Maximum der Phosphorylierung nach 5-minütiger Stimulation ($n = 3$).

Abbildung 4.22 zeigt den zeitlichen Verlauf der Phosphorylierung von Serin 45 in β -catenin nach der Stimulation durch Internalin A. Ausgehend von einem schwachen basalen Level an phosphoryliertem β -catenin steigt das Signal auf die 3-fache Intensität nach 5 Minuten an. Die Abschwächung des Signals ist etwas langsamer als der Anstieg. Die Signale wurden auf Gesamt- β -catenin normalisiert. Anhand des zeitlichen Verlaufes der Phosphorylierung von β -catenin ist von seiner Internalin A-induzierten Dissoziation aus dem E-cadherin-Komplex auszugehen. Die Phosphorylierung und anschließende Degradation von β -catenin ist somit ein Effekt der durch die Bindung von Internalin A an E-cadherin ausgelöst wird, aber vermutlich nicht direkt zur eigentlichen Endozytose des E-cadherin Komplexes beiträgt. Allerdings kann die Phosphorylierung von β -catenin an S45 als eine charakteristische Folgereaktion für den Abbau und damit die Endozytose des E-cadherin Komplexes angesehen werden.

Phosphorylierung von E-cadherin an Y753

Die Phosphorylierung von E-cadherin ist der erste Schritt in der Clathrin-vermittelten Endozytose des Adhäsionsproteins. Falls *Listeria monocytogenes* diesen Prozess für seine Aufnahme in nicht professionell phagozytierende Zellen ausnutzt, sollte die Bindung von Internalin A zu einer Phosphorylierung von E-cadherin führen. Die relevante Phosphorylierungsstelle konnte in 4.3.3 ermittelt und ein phosphospezifischer Antikörper generiert werden. Zur Beantwortung der Frage, ob die Bindung von Internalin A an E-cadherin eine Phosphorylierung an Tyrosin 753 induziert, wurden Zellen mit Internalin A inkubiert und Lysate mittels Immunodetektion analysiert.

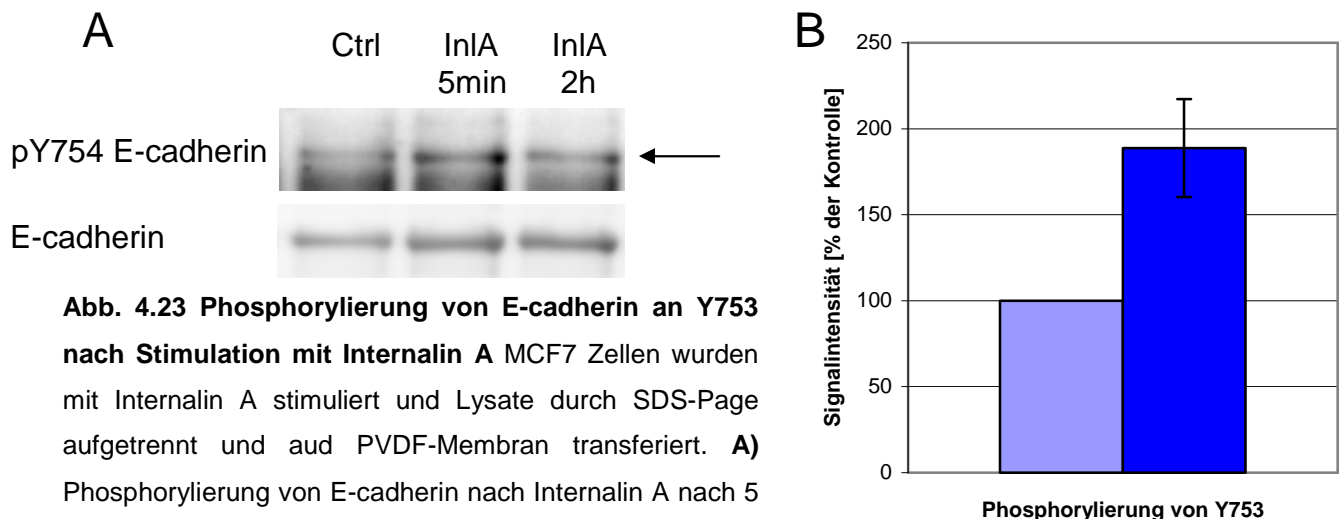


Abb. 4.23 Phosphorylierung von E-cadherin an Y753

nach **Stimulation mit Internalin A** MCF7 Zellen wurden mit Internalin A stimuliert und Lysate durch SDS-Page aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. **A)** Phosphorylierung von E-cadherin nach Internalin A nach 5 Minuten bzw. 2 Stunden (Pfeil). **B)** Phosphorylierung von E-cadherin an Y753 nach 5-minütiger Stimulation mit Internalin A. Die Detektion erfolgte mit dem Antikörper B sub (n = 3).

In Abbildung 4.23 ist zu erkennen, dass E-cadherin auf einem niedrigen basalen Niveau auch in unstimulierten Zellen an Y753 phosphoryliert ist. Nach einer 5-minütigen Inkubationsdauer mit Internalin A verdoppelt sich das Signal und damit der Grad der Phosphorylierung von E-cadherin an Y753 fast im Vergleich mit unbehandelten Zellen. Nach 2 Stunden ist das Phosphorylierungsniveau auf den Ausgangswert zurückgekehrt.

4.3.6 Reduktion der Hakai-Expression mittels RNA-Interferenz

Wurde E-cadherin an der vermuteten Position Y753 phosphoryliert, dissoziiert p120 aus dem Komplex. Hakai bindet mit seiner SH2-Domäne an das phosphorylierte E-cadherin und synthetisiert Ubiquitin an das Adhäsionsmolekül. Die Ubiquitinierung ist das Signal für die Rekrutierung von Proteinen, welche bei der Clathrin-vermittelten Endozytose von Rezeptoren notwendig sind. Damit liegt der Endozytose von E-cadherin ein prinzipiell ähnlicher Mechanismus wie der Endozytose anderer Rezeptoren wie c-Met zugrunde (Taher, 2002). Eine transiente Reduktion der Hakai-Expression mittels RNA-Interferenz sollte demnach zu einer verminderten Endozytose von E-cadherin führen. Damit wäre eine verminderte Effizienz der auf Internalin A beruhenden Infektion durch *Listeria monocytogenes* denkbar. Zur Untersuchung, ob *Listeria* den Mechanismus der Clathrin-vermittelte Endozytose von E-cadherin nutzt, um in nicht phagozytierende Zellen einzudringen, wurde zunächst die Expression von Hakai in MCF7-Zellen reduziert und diese Zellen mit *Listeria* infiziert.

Bei der RNA Interferenz bindet die mRNA des zu regulierenden Proteins an eine komplementäre in die Zelle eingebrachte siRNA („Small Interfering RNA“). Doppelsträngige RNA-Moleküle werden in der Zelle schnell abgebaut und behindern die Translation durch die Ribosomen, so dass die Expression des interessierenden Proteins reduziert wird. Als siRNA werden in der Regel kleine, nur zu Teilen der mRNA komplementäre RNA-Moleküle eingesetzt, wobei verschiedene Sequenzen für dasselbe mRNA-Molekül auch verschieden effektiv sein können. Weiterhin können Proteine sehr verschiedene Halbwertszeiten in Zellen haben, so dass zunächst ein Protokoll zu effektiven RNA Interferenz des Proteins Hakai erstellt werden musste. Dazu wurden vier siRNAs, welche zu verschiedenen Bereichen der Hakai mRNA komplementär waren, erworben (Qiagen). Die siRNAs wurden mit einem Transfektionsreagenz gemischt und nach 3.3.6 in die MCF7-Zellen eingebracht. Die Reduktion von Hakai wurde immunologisch detektiert und quantifiziert.

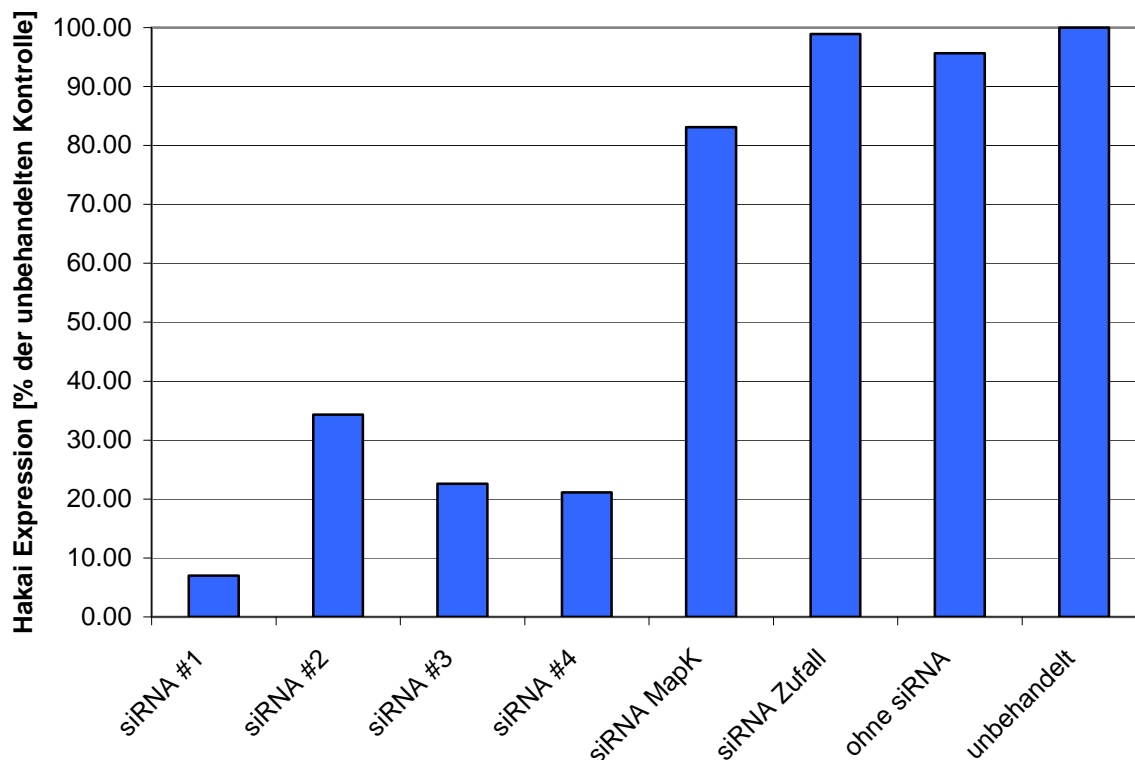


Abb. 4.24 Reduktion der Hakai Expression durch RNA Interferenz Es wurden 4 siRNAs, welche an verschiedene Bereiche des Hakai Gens binden, sowie eine zu MapK und eine Zufallsgenerierte siRNA nach 3.3.6 mit MCF7 Zellen inkubiert. Die Expression von Hakai wurde mittels Western Blot quantifiziert und auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert.

Abbildung 4.24 zeigt die Effektivität der vier eingesetzten siRNAs für das Protein Hakai. Das Hakai-Signal wurde auf das Signal in unbehandelten Zellen normalisiert. Es konnte eine Reduktion der Hakai Expression zwischen 7 und 34 % der unbehandelten Kontrolle erzielt werden. Die RNA-Interferenz mit der mRNA für die Map-Kinase zeigte ebenfalls eine geringe Reduktion, während eine gegen ungerichtete gerichtete siRNA (siRNA Zufall) keine Reduktion zeigte.

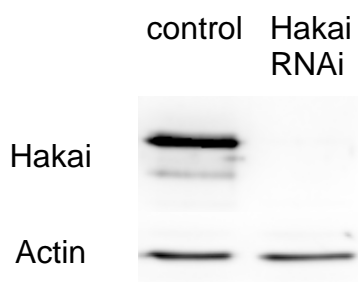


Abb. 4.25 Reduktion der Hakai Expression Durch die Verwendung von einem Gemisch aus 4 siRNAs konnte die Hakai-Expression auf 5-15% reduziert werden.

Die reproduzierbar stärkste Reduktion der Expression von Hakai konnte mit einem Gemisch aus den vier verwendeten siRNAs in MCF7 Zellen erzielt werden (Abb. 4.25). In Caco-2 Zellen führte die RNA Interferenz zu keiner Reduktion der Hakai Expression (Daten nicht gezeigt). Für die anschließenden Infektionsexperimente wurde deshalb ein Gemisch aus vier siRNAs in MCF7 Zellen verwendet.

4.3.7 Der Einfluss von Hakai auf die Infektionseffizienz von *Listeria monocytogenes*

Mit der erfolgreichen Reduktion der Hakai-Expression konnte der Einfluss von Hakai auf die Endozytose von *Listeria monocytogenes* adressiert werden. Bei einer reduzierten Infektionseffizienz bei gleichzeitiger Reduktion der Expression von Hakai läge die Vermutung nahe, dass *Listeria* die Clathrin-vermittelte Endozytose von E-cadherin durch einen noch unbekannten Mechanismus nicht nur induziert, sondern auch zur eigenen Aufnahme in die Zelle ausnutzt. Dazu wurden in MCF7 Zellen die Hakai-Expression nach 3.3.6 reduziert und die Zellen mit den bereits in 4.3.2 eingesetzten *Listeria*-Stämmen infiziert. Zur Ermittlung der Infektionseffizienz wurde der „Gentamicin Protection Assay“ nach 3.3.9 angewendet.

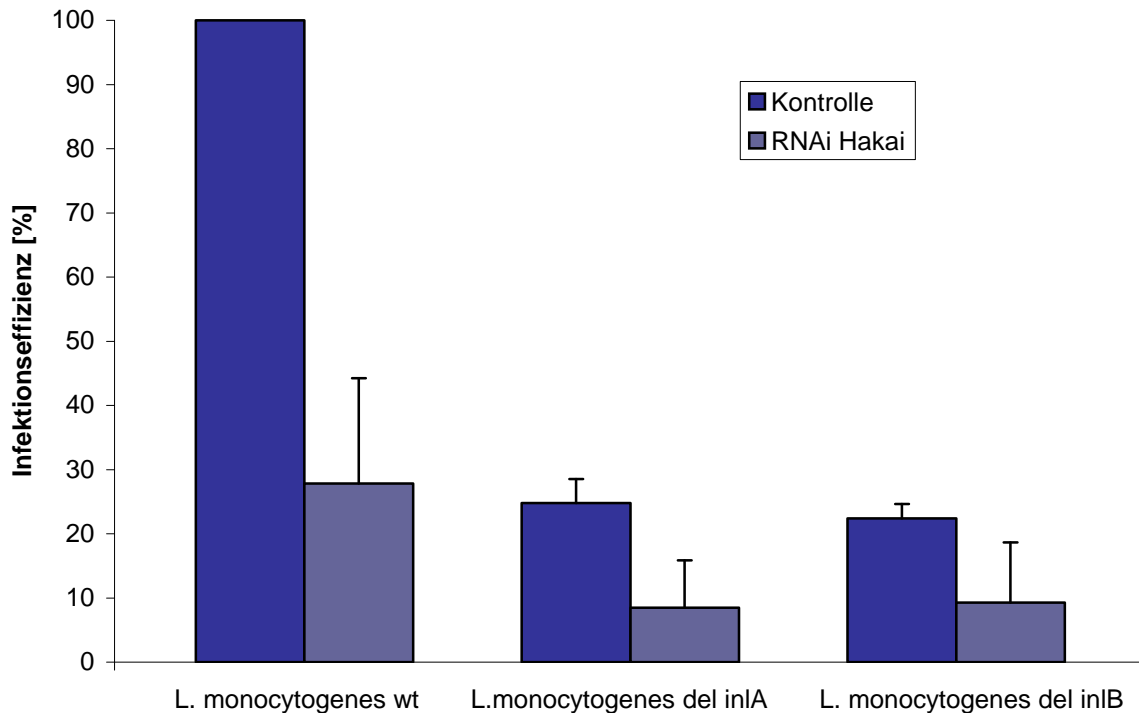


Abb. 4.26 Relevanz von Hakai für die Infektion durch *Listeria monocytogenes* MCF7-Zellen wurden fünf Tage mit Hakai siRNAs (siehe 3.3.6) inkubiert und für 30 Minuten mit Listerien infiziert. Die Infektion mit Listerien des Wildtyps zeigt eine deutliche Reduktion der Infektionseffizienz in Zellen, die Hakai nicht exprimieren. Eine weitere Reduktion ist zu beobachten, wenn den Bakterien die Proteine Internalin A und Internalin B fehlen.

Abbildung 4.26 zeigt die Effizienz der Infektion von Listerien des Wildtyps und der Deletionsmutanten von Internalin A und Internalin B. Die ermittelten Werte wurden auf die Infektionseffizienz von Wildtyp Listerien in Kontrollzellen bezogen. Wird die Hakai-Expression reduziert, reduziert sich die Infektionseffizienz von *Listeria* um mehr als 70 % gegenüber der Kontrolle. Fehlt dem Bakterium das Adhäsionsprotein Internalin A reduziert sich die Infektionseffizienz auf 24,8 %. Die Reduktion der Hakai-Expression bewirkt eine weitere Reduktion der Infektion auf 8,5 %. Nach der Deletion des Internalin B Gens fehlt den Listerien die Möglichkeit, den c-Met Signalweg zu induzieren. Diese Einschränkung wirkt sich ebenfalls auf eine Reduktion der Infektionseffizienz aus. Der Einfluss der Hakai-Expression auf die auf Internalin A zurückzuführende Endozytose der *Listerien* wird durch die weitere Reduktion der Infektionsrate auf 9,3 % deutlich. Somit konnte gezeigt werden, dass die Expression von Hakai für eine effektive Infektion von MCF7 Zellen durch *Listeria*

monocytogenes notwendig ist. Dies lässt den Schluss zu, dass die Internalin A vermittelte Invasion durch *Listeria monocytogenes* auf dem Mechanismus für die Endozytose von E-cadherin beruht, welcher beim Abbau von Zell-Zell-Kontakten zum Einsatz kommt.

5. Diskussion

5.1 Die Verwendung von iTRAQ™ zur massenspektrometrischen Quantifizierung von Proteinen

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die experimentelle Grundlage für die Verwendung von iTRAQ™ zur Quantifizierung von Proteinen zu schaffen. Dazu musste eine umfassende biochemische Charakterisierung der iTRAQ™-Moleküle durchgeführt werden. Auf den in dieser Arbeit generierten experimentellen Daten beruht ein mathematisches Modell, welches eine Bewertung der Glaubwürdigkeit der durch iTRAQ™ produzierten Daten zulässt, welches durch F. Klawonn (Fachhochschule Wolfenbüttel, Computerwissenschaften) und C. Hundertmark (HZI Braunschweig, Proteomgruppe) entwickelt wurde. Die experimentelle Validierung dieses Modells wurde ebenfalls in dieser Arbeit durchgeführt.

5.1.1 Die biochemische Charakterisierung der iTRAQ™-Reagenzien

Bevor eine automatisierte Auswertung auf iTRAQ™-basierender quantitativer Daten möglich ist, mussten systematische Untersuchungen zur Charakterisierung von iTRAQ™-Molekülen durchgeführt werden. Von besonderem Interesse war dabei die Möglichkeit der Detektion falsch positiver iTRAQ™-Signale, welche erheblichen Einfluss auf die Quantifizierung von Peptiden haben können. Dazu wurde zunächst das Vorkommen von Signalen in MS/MS Spektren untersucht, welche eine ähnliche Masse wie iTRAQ™-Reporter aufweisen. In einem nicht markierten Datensatz wurden die Signalintensitäten in einem Massenintervall von 0.02 Dalton um die exakten Reportermassen (114.1112 Da, 115.1083 Da, 116.1116 Da, 117.1150 Da) ausgelesen. Diese Signalintensitäten wurden der Größe nach sortiert und in Abbildung 2.2 dargestellt. Dort ist erkennbar, dass Signale im ausgelesenen Massenbereich auch in nicht-markierten Proben mit verschiedener Häufigkeit vorkommen. Dies ist insbesondere für die Reportermasse 115 bedenklich, da in nahezu 50% aller identifizierten Peptide die Masse mit 10 Counts / Einzelmessung

oder höher gemessen wurde. Diese im iTRAQ™-Reporterbereich detektierten Massen entstehen durch interne Fragmentierungen der vermessenen Peptide. So entstehen zum Beispiel durch die Aminosäuren Alanin-Alanin am N-Terminus sehr intensive a_2 -Ionen (Abspaltung von CO_2) mit einer Masse von 115.0866 Dalton. Die sehr häufig vorkommende Sequenz Glycin-Glycin kann durch ein b_2 Ion (Abspaltung von H_2O) eine Masse von 115.0502 Dalton generieren. Generell können nach internen Fragmentierungen Massen entstehen, die auch nach Abspaltung von Wasser oder Ammoniak, im Massenbereich der Reporterionen liegen. Bei der Vermessung von iTRAQ™-markierten Proben wird meistens ein Q-ToF Massenspektrometer eingesetzt. Während der Fragmentierung von Peptiden in der Quadrupol-Einheit des Gerätes entstehen jedoch präferenziell y - und b -Ionen. Interne Fragmentierungen sind eher selten, können aber vermehrt in einer Prolin-haltigen Sequenz entstehen.

Das Auslesen von iTRAQ™-Reporter-Ionen in nicht-markierten Proben zeigt zum einen, dass wegen der Häufigkeit von Fragmenten, welche zur Detektion von falsch-positiven iTRAQ™-Signalen führen können, die iTRAQ™-Reagenzien 115 und 116 nur verwendet werden sollten, falls die Art der Analyse einen Vergleich von 4 Proben nötig macht.

Weiterhin hebt die häufige falsch positive Detektion des Reporters 115 die Notwendigkeit einer vollständigen Markierung aller N-Termini in der Probe mit iTRAQ™-Molekülen hervor. Nur so lässt sich sicherstellen, dass N-terminale Peptid-Fragmente nicht im gleichen Massenbereich detektiert werden, wie iTRAQ™-Reporter. Ein wesentlicher Punkt, der durch diese Experimente hervorgehoben wird, ist die Genauigkeit des automatischen Ausleseverfahrens für die iTRAQ™-Reporter, beziehungsweise die Massengenauigkeit des verwendeten Massenspektrometers. Die oben genannten N-terminalen Fragmente oder andere interne Peptidfragmente, deren Masse im Massenbereich um 115 Dalton liegen, zeigen nur eine geringe Massendifferenz zum Molekulargewicht des iTRAQ™-Reporters. Ist das Massenspektrometer nicht in der Lage, diese Massendifferenz aufzulösen, oder wurde das Gerät nur unzureichend im niedermolekularen Bereich für MS/MS-Spektren kalibriert, muss die Software, welche die iTRAQ™-Reporter erkennt, so angepasst werden, dass diese Erkennung einen größeren Massenbereich um das

Reporter-Ion ausliest und somit jedoch die Wahrscheinlichkeit, ein internes Fragment zu detektieren, ansteigt. Dabei kann die Art der Massendetektion ebenfalls einen Einfluss auf die Massengenauigkeit haben, da die dazu hier verwendete ToF-Einheit sehr anfällig gegenüber kleinen Temperaturschwankungen ist und zusätzlich eine Nullpunktverschiebung mit Fortschreiten der Messdauer zeigt.

Diese Betrachtungen zeigen, dass bei iTRAQ™-Analysen massenspektrometrische Parameter, welche in der Regel zu einer zuverlässigen Identifizierung von Proteinen in nicht-markierten Proben führt, so angepasst werden müssen, dass zum einen die Identifizierung des Proteins noch möglich ist und zum anderen optimale Bedingungen für eine Fragmentierung des iTRAQ™-Moleküls hergestellt werden. Dies sind prinzipiell zwei gegenläufige Zielsetzungen, da für eine zuverlässige Identifizierung von Peptidsequenzen das Massenspektrometer im Massenbereich von 50-1600 Dalton möglichst genau kalibriert sein muss, während das genaue Auslesen von iTRAQ™-Reportern eine hohe Massengenauigkeit und Auflösung bei unter 120 Dalton erfordert. Ungenauigkeiten, welche für eine Identifizierung von Peptiden akzeptiert werden können, können zu einer Detektion von internen Fragmenten als iTRAQ™-Reporter führen. Kommt bei automatischen Messungen eine Temperatur- und Nullpunktverschiebungs-anfällige Detektor-Einheit zum Einsatz, vergrößert dies die Wahrscheinlichkeit, falsche iTRAQ™-Reporter zu detektieren. Zur Generierung hoher Reporterintensitäten ist eine tendenziell höhere Kollisionsenergie nötig, als für eine gleichmäßige Fragmentierung von Peptiden und damit für eine zuverlässige Identifizierung angewendet werden sollte. Daraus resultiert, dass bei iTRAQ™-Analysen ein Kompromiss zwischen optimaler Identifizierung und optimaler Quantifizierung gemacht werden muss. Alternativ wäre es denkbar für jede Probe zwei Analysen durchzuführen. Die erste Analyse könnte sich auf die Identifizierung von Proteinen mit entsprechend optimalen massenspektrometrischen Parametern beschränken, während bei der zweiten Analyse die Parameter für eine Quantifizierung angepasst werden. Diese Vorgehensweise setzt allerdings eine hohe Reproduzierbarkeit der chromatographischen Auftrennung voraus, damit sich den quantitativen Daten identifizierte Peptide zuordnen lassen. Neben dem deutlich erhöhten Aufwand bei der Auswertung eines solchen Experimentes wäre es ebenfalls von Nachteil, dass die doppelte Materialmenge benötigt würde.

Die Varianz der iTRAQ™-Reporterionen in Abhängigkeit von der Signalintensität wurde anhand der Analyse einer nicht regulierten Probe gezeigt (Abb. 2.2). Die Varianz nimmt mit steigender Intensität ab und nähert sich einem Wert ungleich null. Die Grundannahme der mathematischen Modellierung durch F. Klawonn (Fachhochschule Wolfenbüttel, Computerwissenschaften) und C. Hundermark (HZI Braunschweig, Proteomgruppe) ist, dass die Intensität des iTRAQ™-Signals um einen konstanten und einen variablen Betrag, der von der absoluten Intensität des Signals abhängt, rauscht. Zur Charakterisierung dieses Effektes wurde sich die Beobachtung zunutze gemacht, dass die Intensität der Reporterionen direkt durch die Parameter des Massenspektrometers beeinflusst werden können. Eine niedrig eingestellte Kollisionsenergie bewirkt eine herabgesetzte Fragmentierung des Peptids und der iTRAQ™-Markierung, so dass Reporterionen geringer Intensität entstehen, während eine erhöhte Kollisionsenergie eine stärkere Fragmentierung des Peptids bewirkt und damit auch die Intensität der iTRAQ™-Reporter zunimmt. Diese Beobachtung konnte für eine Abschätzung des relativen und absoluten Rauschens der Reporterintensitäten genutzt werden. Dafür wurden 2 synthetische Peptide verschiedener Sequenz mit iTRAQ™ markiert und unter der Verwendung verschiedener Kollisionsenergien fragmentiert. Bei einer Peptidsequenz handelte es sich um ein kurzes Peptid mit einem Lysin am C-Terminus. Diese Art Peptid generiert durch seine 2 iTRAQ™-Moleküle pro Peptidmolekül besonders intensive Reporterionen, während das zweite, längere Peptid mit einem iTRAQ™-Molekül eher geringe Reporter-Intensitäten erzeugt. Die Fragmentierung im Massenspektrometer führte zu Datensätzen mit je 100 Reporterintensitäten pro eingestellter Kollisionsenergie mit Reporterintensitäten zwischen 3 und 503 Counts / Einzelmessung. Die artifizielle Beeinflussung der Reporterintensitäten durch die Variation der Kollisionsbedingungen konnte zur Generierung eines mathematischen Modells eingesetzt werden. Dieses „Rauschmodell“ ist Teil der Dissertation von C. Hundermark (HZI Braunschweig, Proteomgruppe) und wird an entsprechender Stelle näher erläutert werden.

Zur Validierung dieses Modells wurde eine definierte Probe aus 5 Proteinen verdaut, zu gleichen Teilen aufgeteilt und mit verschiedenen iTRAQ™-Molekülen markiert. Da bei der Erstellung des Modells davon ausgegangen wurde, dass 95% aller detektieren Intensitäten durch das Rauschmodell erfasst werden, sollten auch 95%

der in der Validierungsprobe ermittelten Regulationsfaktoren kleinere Abweichungen vom Regulationsfaktor 1 aufweisen, als durch das mathematische Modell vorgegeben. Von den 563 ermittelten Regulationswerten der identifizierten Peptide befinden sich 93,8% innerhalb der durch das Rauschmodell vorgegebenen Grenzen, die einen nicht-regulierten Zustand beschreiben. Somit konnte ein mathematisches Modell für die Beschreibung des Rauschverhaltens von iTRAQ™-Reportern im verwendeten Massenspektrometer erstellt werden. Es ist hervorzuheben, dass die mathematische Beziehung charakteristisch für das Rauschverhalten von iTRAQ™-Reportern ist, aber bei der Verwendung eines anderen Massenspektrometers andere Werte für die Kenngrößen empirisch ermittelt werden müssen. Für eine statistisch optimierte Auswertung von auf iTRAQ™ beruhenden Regulationsanalysen, welche mit anderen Massenspektrometern durchgeführt wurden, ist es deshalb nötig, die hier durchgeführten Experimente für die Bestimmung der Rauschparameter zu wiederholen und zu validieren.

Das erstellte Modell zur Schätzung des wahrscheinlichsten Regulationsfaktors auf Basis der Signalintensitäten ist für die Analyse von posttranslationalen Modifikationen von besonderem Interesse, da hier Regulationen nicht auf Proteinebene, sondern auf Peptidebene detektiert werden müssen. Das bedeutet, dass für die Detektion einer differentiellen posttranslationalen Modifikation an einem Protein nur das Peptid zur Verfügung steht, an welchem die Modifikation direkt nachweisbar ist. Der ermittelte Regulationsfaktor beruht in einem solchen Fall also nur auf den Intensitäten eines Datenpaares, während bei differentiell expremierten Proteinen die ermittelten Regulationsfaktoren aller Peptide des Proteins zur Berechnung und statistischen Absicherung des Regulationsfaktors herangezogen werden können. Die Abschätzung von Regulationsfaktoren auf Einzel-Peptidebene ist von besonderer Bedeutung bei der Untersuchung differentieller posttranslationaler Modifikationen.

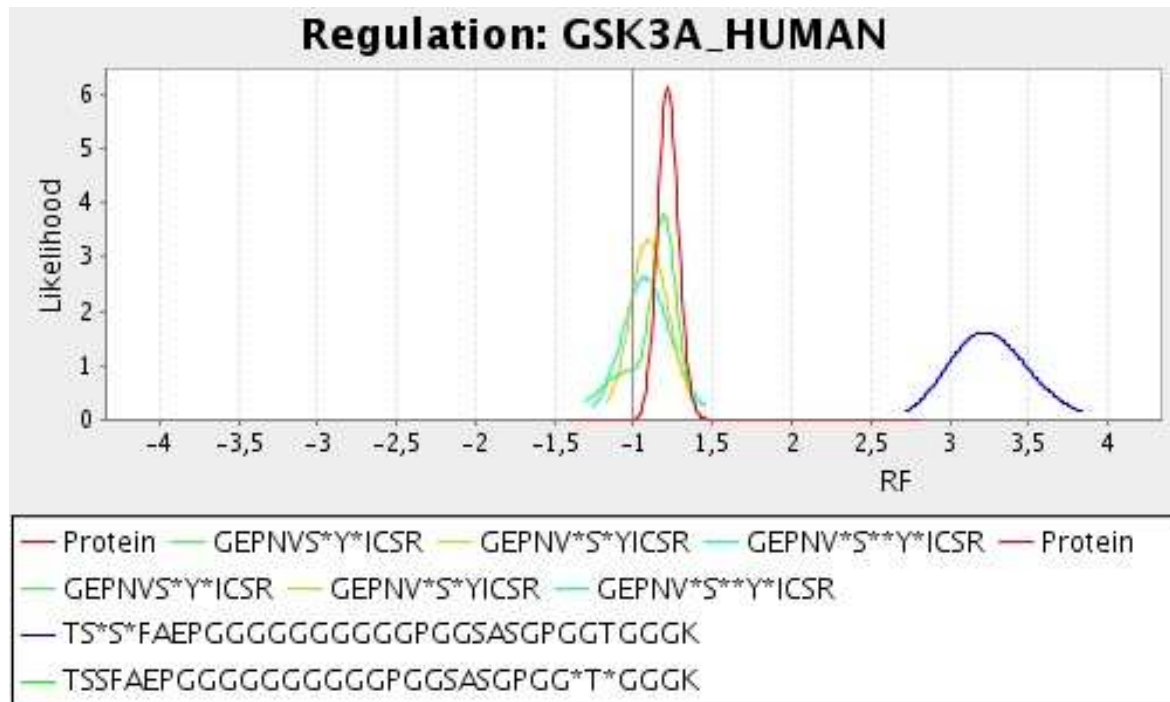


Abb. 5.1 Automatische Regulationsanalyse von Proteinen und Phosphorylierungsstellen In rot ist die Wahrscheinlichkeitsfunktion für den Regulationsfaktor des Proteins GSK3 α aufgetragen. Das Lot des Maximums entspricht dem ermittelten Regulationsfaktor. In den Farben Türkis, Gelb, Grün und Blau sind die Kurven detektierter Phosphopeptide von GSK3 α zu sehen. Der Regulationsfaktor des in blau dargestellten Peptids ist größer als der des Proteins. Damit handelt es sich um eine regulierte Phosphorylierungsstelle (Quelle: T. Reinl, HZI Braunschweig, Proteomgruppe).

In Abbildung 5.1 ist beispielhaft die Detektion einer differentiellen Phosphorylierung in der Kinase GSK3 α dargestellt. Das Protein wurde mit mehreren Peptiden massenspektrometrisch identifiziert. Die Regulationsfaktoren der einzelnen Peptide wurden zu einem Regulationsfaktor auf Proteinebene umgerechnet. Dieser Regulationsfaktor liegt bei 1 was in diesem Fall bedeutet, dass das Protein zu gleichen Mengen in den beiden untersuchten Proben vorhanden war. Weiterhin wurden 4 phosphorylierte Peptide detektiert. Die Regulationsfaktoren von dreien dieser Peptide liegen ebenfalls um 1, so dass hier keine differentielle Phosphorylierung stattgefunden haben kann. Das vierte Phosphopeptid wurde mit einem wahrscheinlichsten Regulationsfaktor von 3,2 quantifiziert. In diesem Fall kann man also von einer differentiellen Phosphorylierung von GSK3 α in den verglichenen Proben ausgehen. Abbildung 5.1 zeigt also, dass die in dieser Arbeit durchgeführte biochemische Charakterisierung von iTRAQ™-Reagenzien als Datengrundlage nicht nur für die Regulationsanalyse komplexer Proben auf Expressionsebene dienen kann. Mit der Anwendung des auf dieser Arbeit gründenden Modells auf die

quantitative Analyse posttranslationaler Modifikationen wie der Phosphorylierung konnte ein Analyseverfahren etabliert werden, welches bereits in zahlreichen Projekten tägliche Anwendung findet.

Die Untersuchungen zur Reaktionskinetik von iTRAQ™-Molekülen zeigten, dass bereits vor dem Start der Reaktion verschiedene Mengen iTRAQ™-Reagenz, welches bereits mit Wasser oder Ethanol abreagiert war, in der Probe vorhanden waren. Diese Beobachtung ist insofern kritisch, dass die Anzahl reaktiver iTRAQ™-Moleküle in einem Reaktionsansatz dafür ausreichen muss, um eine vollständige Derivatisierung aller primären Aminogruppen zu ermöglichen. Da die Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration der Reaktionspartner abhängt, muss ausreichend aktives iTRAQ™-Reagenz im Reaktionsansatz vorhanden sein, um eine vollständige Reaktion innerhalb der vom Hersteller (Applied Biosystems) angegebenen 60 Minuten zu gewährleisten. Da die Reagenzien bereits bei Auslieferung suspendiert vorliegen, kann man die Reaktion von iTRAQ™-Molekülen mit Wasser oder Ethanol als Alterungsprozess ansehen, der eine Verwendung innerhalb gewisser zeitlicher Grenzen impliziert, um sicherzustellen, dass eine Markierungsreaktion vollständig abläuft.

Der Vergleich der Reaktionsprodukte der verschiedenen iTRAQ™-Moleküle mit Wasser bzw. Ethanol zu Beginn der Reaktion mit der Verteilung der iTRAQ-Reporter nach 180 Minuten, zeigte ein unerwartetes Ergebnis. Da die iTRAQ™-Reporter eine identische chemische Struktur aufweisen, würde man auch identische Reaktionsgeschwindigkeiten der verschiedenen Moleküle erwarten. Von den iTRAQ™-Reagenzien 114 und 117 konnten beim Reaktionsprodukt mit Wasser identische Mengen abreagierter Reagenzien zu Beginn der Reaktion festgestellt werden. Nach 180 Minuten war die Signalintensität des Reporters 117 etwa 25% stärker als die des Reporters 114. Daraus lässt sich eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit für das Molekül 117 folgern. Ein ähnlicher Zusammenhang konnte beim Reaktionsprodukt mit Ethanol festgestellt werden. Da sich die iTRAQ™-Reagenzien einzig in der Isotopen-Zusammensetzung unterscheiden, wäre hier die Ursache für verschiedene Reaktionsgeschwindigkeiten zu suchen. Den Einfluss von Isotopen auf die Reaktionsgeschwindigkeit beschreibt der sogenannte „Kinetische Isotopeneffekt“. Beim primären kinetischen Isotopeneffekt ist das reagierende Atom

selbst durch ein schwereres Isotop ausgetauscht, beim sekundären Effekt das benachbarte Atom. Beide Effekte erhöhen die Aktivierungsenergie einer chemischen Reaktion, was eine Absenkung der Reaktionsgeschwindigkeit bedeutet. Bei der Reaktion eines iTRAQ™-Moleküls mit einer primären Aminogruppe eines Peptids wird eine neue kovalente Bindung zwischen dem Kohlenstoff-Atom der „Balancer“-Gruppe und dem Stickstoff der Aminogruppe gebildet. Bei iTRAQ™-Reagenz 117 handelt es sich bei dem Kohlenstoff-Atom um das 12 Dalton Isotop, während beim Reagenz 114 sowohl der Kohlenstoff als auch der benachbarte Sauerstoff durch schwere Isotope substituiert sind. Da in der „Balancer“-Gruppe von iTRAQ™-Molekül 117 keine schweren Isotopen vorhanden sind, wäre die höchste Reaktionsgeschwindigkeit unter den iTRAQ™-Reagenzien mit dem kinetischen Isotopeneffekt zu erklären. Für eine nähere Charakterisierung dieses Effektes sind jedoch weitere Experimente notwendig. Es ist hervorzuheben, dass in einem echten Reaktionsansatz der kinetische Isotopeneffekt keine relevante Rolle spielt, da dort die Reaktion unter leicht basischen Bedingungen mit primären Aminogruppen vermutlich erheblich schneller abläuft als unter den hier verwendeten sauren Bedingungen mit Wasser oder Ethanol.

5.1.2 Anwendbarkeit von iTRAQ™ zur Regulationsanalyse von Proteinen

Die quantitative Proteomanalyse ist ein Teilgebiet der Proteomforschung, welches in den letzten Jahren zahlreiche Methoden zur Analyse von Regulationsereignissen hervorgebracht hat. Diese Methoden lassen sich in gel-basierte und gel-freie Methoden aufteilen. Exemplarisch werden an dieser Stelle die Methoden DIGE („Differential In Gel Electrophoresis“, Ünlü et al., 1997) und SILAC („Stable Isotope Labelling with Amino acids in Cell culture“, Ong et al., 2002) sowie das in dieser Arbeit charakterisierte iTRAQ™ („Isotope Tags for Relative and Absolute Quantification“, Applied Biosystems) mit besonderem Fokus auf ihre Anwendbarkeit in der Regulationsanalyse diskutiert.

Durch die differentielle Markierung ermöglicht das DIGE System einen Vergleich differentiell markierter Proteine in einem Gel. Die Auftrennung der Proteine erfolgt in der ersten Dimension über den isoelektrischen Punkt und in der zweiten Dimension über das Molekulargewicht des Proteins. Die aufgetrennten Proteine werden indirekt über die Detektion der Fluoreszenz-Markierung nachgewiesen. Die Intensität des Signals lässt sich zu einer Quantifizierung nutzen. Da bei DIGE ein interner Standard verwendet wird, gelten Regulationsfaktoren von 1,5 allgemein als ausreichend um von einer qualitativen Regulation zu sprechen. Kolkman et al. (2005) verglichen die Quantifizierung von Proteinen durch DIGE mit der massenspektrometrischen Quantifizierung nach einer metabolischen Stickstoff-Markierung des Proteoms von *Saccharomyces cerevisiae* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Dabei zeigte sich, dass mit DIGE generell ein kleineres Verhältnis zwischen Signal und Rauschen detektiert wurde, als bei der massenspektrometrischen Regulationsanalyse. Unter der Annahme, dass der dynamische Bereich des Detektors beim DIGE-Verfahren geringer ist, als der des Massendetektors, resultiert daraus, dass Regulationsfaktoren bei DIGE eher unterschätzt werden und stark exprimierte und gleichzeitig regulierte Proteine nicht erkannt werden können. Der direkte Vergleich beider Technologien ist jedoch nur eingeschränkt möglich, da sowohl Sensitivität als auch der dynamische Bereich der Detektionsverfahren sich unterscheiden.

Während man bei einer Gel-basierenden Regulationsanalyse in der Regel nur einen Regulationswert pro Protein erhält, generiert in der Massenspektrometrie jedes detektierte Peptid einen Regulationsfaktor, so dass Regulationsfaktoren für Proteine, welche mit mehreren Peptiden detektiert und quantifiziert werden eine höhere Signifikanz haben können, als Proteine, welche nur mit einem Peptid identifiziert werden konnten. Bei den verschiedenen massenspektrometrischen Methoden, welche zur Protein-Quantifizierung eingesetzt werden, ist insbesondere die metabolische Markierung des Proteoms durch stabile Isotopen (SILAC) zu nennen. SILAC bietet den Vorteil, dass das zu quantifizierende Proteom bereits vor der Protein-Aufreinigung markiert wurde, so dass bereits das Zellmaterial gemischt werden kann und alle folgenden Prozessierungsschritte nicht in getrennten Ansätzen durchgeführt werden müssen. Wesentliche Nachteile sind die mit jeder Markierung erhöhte Komplexität der Probe, da differentiell markierten Peptide gleicher Sequenz

verschiedene Muttermassen haben und die Einschränkung, dass nur kultiviertes Material markiert und damit quantifiziert werden kann. Damit ist SILAC insbesondere für diagnostische Verfahren nicht einsetzbar.

Die Kombination einer differentiellen Markierung von Peptiden mit iTRAQ™-Molekülen und ihrer chromatographischen Auftrennung mit massenspektrometrischen Analyseverfahren (LC-MS/MS) bietet gegenüber SILAC einige Vorteile. Die Identifizierung der Aminosäuresequenz und Quantifizierung jedes Peptids lässt sich anhand desselben Spektrums durchführen, so dass der analytische Aufwand im Vergleich zu einer unmarkierten Probe nicht erhöht wird. Da die Markierung mit iTRAQ™-Molekülen nach der Generierung der Probe durchgeführt wird, lassen sich auch Primärproben quantitativ analysieren. Besondere Kultivierungsbedingungen sind nicht notwendig.

5.2 Identifizierung und Quantifizierung phosphorylierter Proteine und ihrer Kinasen nach Internalin A Stimulation

In 4.2 wurde eine Methode entwickelt, welche es ermöglicht eine systematische Analyse von aktivierten Kinasen in stimulierten Zellen durchzuführen. Dazu wurden Zellen der Zelllinien MCF7 und Caco-2 mit rekombinantem Internalin A für 5 Minuten stimuliert und nach Zellyse phosphorylierte Proteine durch IMAC („Immobilized Metal Affinity Chromatography“) angereichert. Diese Proteine wurden mit iTRAQ™-Reagenzien quantifiziert und das in 4.1 validierte Modell zur Auswertung von quantitativen Daten angewendet. Durch die Phospho-spezifische Anreicherung von Proteinen sollten solche Proteine abundanter sein, welche als Reaktion der Zelle auf die Stimulierung durch Internalin A phosphoryliert wurden. Proteine, welche in beiden Zelllinien phosphoryliert wurden (Tabelle 2.1), können als Zelltyp-unabhängig aber Internalin A spezifisch phosphorylierte Proteine angesehen werden.

In MCF7 und Caco-2 Zellen konnte nach Stimulation durch Internalin A eine erhöhte Phosphorylierung des Proteins EVL (Ena/VASP-like protein) detektiert werden. EVL gehört zur Familie der Ena/VASP-Proteine (*Drosophila* Enabled / vasodilator-

stimulated phosphoprotein) welche das Aktin-Zytoskelett remodulieren können. In migrationsfähigen Zellen regulieren Ena/VASP-Proteine die Bildung von Filopodien und Lamellipodien. EVL verstärkt die Polymerisation von Aktin und wurde bereits in Zusammenhang mit *Listeria monocytogenes* als Protein beschrieben, welches an das listerielle Protein ActA bindet und zur intrazellulären Fortbewegung von *Listeria* durch gezielte Aktin-Polymerisation genutzt wird (Chakraborty, 1995; Machner, 2001). Ena/VASP Proteine wurde von Bierne et al. (2005) auch in Zusammenhang mit der Internalin B-vermittelten Aufnahme von *Listeria monocytogenes* gebracht. Demnach werden Ena/VASP-Proteine zur Eintrittsstelle von *Listeria* rekrutiert, wobei eine Reduktion der VASP-Expression durch RNA-Interferenz zu einer signifikanten Reduktion der Invasionseffizienz von *Listeria* führte. Ein Zusammenhang zwischen der Internalin A vermittelten Aufnahme von *Listeria* und der Phosphorylierung von EVL ist bisher nicht bekannt, jedoch wurde durch Scott et al. (2006) gezeigt, dass Ena/VASP-Proteine nach homophilen Interaktionen zwischen E-cadherin-Molekülen in Zell-Zell-Kontakte rekrutiert werden und die Assoziation an das Aktin-Zytoskelett regulieren. Somit wäre es denkbar, dass EVL nach der Bindung von Internalin A an E-cadherin in den E-cadherin-Komplex rekrutiert wird und lokal die Aktin-Polymerisation in eine Richtung reguliert, welche die Aufnahme von *Listeria* begünstigt.

Neben weiteren Proteinen wurde die leichte Kette von Kinesin als nach Internalin A Stimulation als potentiell phosphoryliert detektiert. Kinesin ist ein Motorprotein, welches entlang von Microtubuli Organellen und Protein-Komplexe transportieren kann. Chen et al. (2003) zeigte, dass Kinesin an das E-cadherin assoziierte Protein p120 catenin binden kann. Für einen effizienten Transport von N-cadherin in Zell-Zell-Kontakte ist eine Bindung von Kinesin an p120 notwendig. Während Kinesin 2 für den Transport von späten Endo- und Lysosomen (Brown et al., 2005) relevant ist, ist das hier nachgewiesene Kinesin 1 am Mikrotubuli-assoziierten Transport von frühen Endo- und Lysosomen beteiligt. Kuhn (1998) konnte zeigen, dass die Aufnahme von *Listeria* in Gegenwart der Microtubuli depolymerisierenden Agentien Nocodazol und Colchicin reduziert ist. Zusammen mit der Erkenntnis, dass die Membran-assoziierte schwere Kette von Kinesin eine verstärkte Phosphorylierung zeigt (Lee et al., 1995), ist eine Phosphorylierung und Rekrutierung von Kinesin an den Eintrittsort von *Listeria* denkbar. Im gleichen Zusammenhang ist die verstärkte

Phosphorylierung von VP33B von Interesse. VP33B ist ein Membran-assoziiertes Protein, welches am Vesikel-vermittelten Transport von Proteinen in lysosomale Kompartimente und an der Fusion von späten Endosomen und Lysosomen beteiligt ist. Bezüge zu E-cadherin oder *Listeria* sind bisher nicht bekannt. Kinasen, die mit VP33B interagieren oder Phosphorylierungsstellen sind bisher nicht bekannt .

Es ist auffällig, dass von 11 Proteinen, welche nach 5-minütiger Internalin A Stimulation als verstärkt phosphoryliert detektiert wurden, 4 Proteine für einen Transport von Vesikeln und eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts relevant sind. Ebenfalls 4 Proteine sind Bestandteil des Apparates zur Protein-Expression (PRP4, PRP8, DTD1 und UT14A; siehe Tabelle 2.1), so dass auch ein Einfluss der Internalin A-Bindung an die Wirtszelle auf die Protein-Expression in der Wirtszelle denkbar wäre.

In 4.2.2 wurde eine systematische Suche nach den Kinasen durchgeführt, von denen bekannt ist, dass sie die differentiell regulierten Substrate aus 4.2.1 phosphorylieren oder an sie binden. Kinasen, welche in beiden Zelllinien demnach als aktiviert angesehen werden können, wurden in Tabelle 2.2 aufgelistet. Neben einigen Kinasen aus der Familie der MAP-Kinasen wurden auch EGFR und Src als putativ aktiviert identifiziert. Diese Tyrosin-Kinasen stehen im Verdacht, E-cadherin zu phosphorylieren und eine Endozytose des E-cadherin-Komplexes zu induzieren. Die Aktivierung von Akt1 deutet ebenfalls auf eine Aktivierung der EGFR-Signalkaskade hin.

Die Identifikation von neuen potentiell an bestimmten Signalwegen beteiligten Kinasen und Substraten ist in der Regel Hypothesen-getrieben, was bedeutet, dass aufgestellte funktionelle Hypothesen anschließend experimentell durch die Perturbation des biologischen Modellsystems bestätigt oder widerlegt werden. Die genau entgegengesetzte Herangehensweise ist eine erwartungstreue Identifizierung von den meist zahlreichen Komponenten des Modellsystems nach einer Perturbation. Differentiell regulierte Komponenten können zur Hypothesenbildung herangezogen werden. Eine Erweiterung dieser Herangehensweise stellt die hier vorgestellte Methode zur Identifizierung und Quantifizierung phosphorylierter Proteine und ihrer Kinasen nach Internalin A Stimulation dar. Nach einer Perturbation

zweier verschiedener Modellsysteme (MCF7 und Caco-2) wurden phosphorylierte Proteine angereichert und differentielle Phosphorylierungsergebnisse massenspektrometrisch detektiert. Eine Lokalisierung von Phosphorylierungsstellen und eine Abschätzung der physiologischen Signifikanz sind mit diesem Ansatz jedoch nicht möglich. Allerdings gibt eine differentielle Phosphorylierung eines Proteins indirekte Hinweise auf zelluläre Vorgänge die durch die Perturbation – hier Stimulation mit Internalin A – ausgelöst wurden, wenn Interaktionsdaten des differentiell phosphorylierten Proteins mit Kinasen existieren. Die systematische Suche solcher Interaktionsdaten wurde in diesem Projekt durch das kommerzielle Computer-Programm Pathway Studio (Ariadne Genomics) und die Fachliteraturbasierte Interaktions-Datenbank Resnet ermöglicht. Die systematische Suche nach Kinasen, die eine differentielle Phosphorylierung eines Proteins nach Perturbation zweier Zellsysteme auslösen kann, generierte eine Liste von Kinasen, welche im Zusammenhang mit der Bindung von Internalin A an die Wirtszelle aktiviert worden sein könnten. Die Überprüfung der Aktivierung jeder Kinase steht noch aus und könnte Thema weiterer Arbeiten sein.

5.3 Die Internalin A vermittelte Endozytose von *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes kann über verschiedene Signalwege die Aufnahme in eine Wirtszelle einleiten. Zum einen wird durch die Bindung des Proteins Internalin B an den Met-Rezeptor eine lokale Reorganisation des Aktin-Zytoskelettes eingeleitet, was neben anderen Mechanismen zur Aufnahme des Bakterium führt. Die Aktivierung des Met-Rezeptors führt zu seiner Ubiquitinierung und schließlich zur Clathrin-vermittelten Endozytose von Met in Hela Zellen (Veiga et al., 2005). Einen weiteren Mechanismus, der zur Aufnahme des Bakterium führen kann, stellt die Bindung des listeriellen Proteins Internalin A an das Adhäsionsprotein E-cadherin dar. Während die molekularen Mechanismen, welche durch die Bindung von Internalin B an Met induziert werden, in den Grundzügen bekannt sind (Übersicht von Hamon et al., 2006), existiert für die Internalin A induzierte Aufnahme von E-cadherin nur ein Modell, welches die Rekrutierung von Vezatin, ARHGAP10 und Myosin VIIa in den E-cadherin Protein-Komplex vorschlägt (Sousa et al., 2005). Demnach wird

das Bakterium mit derselben Kraft in die Zelle hineingezogen, welche in einem Geweben auf die Kontaktfläche zweier benachbarter Zellen ausgeübt wird. In der Publikation von Veiga et al. (2007) konnte gezeigt werden, dass nicht nur für die Internalin B- sondern auch für die Internalin A-vermittelte Aufnahme von *Listeria monocytogenes* in JEG3 Zellen Clathrin notwendig ist.

Pentecost et al. (2006) konnte zeigen, dass die physiologische Eintrittsstelle von *Listeria* die Spitzen der Darmzotten im Wirtsorganismus sind. E-cadherin ist in Darmepithelzellen weniger auf den apicalen Oberflächen der Zellen, als in den lateralen Kontaktflächen lokalisiert. Da Internalin A nicht dazu in der Lage ist, E-cadherin Verknüpfungen benachbarter Zellen aufzubrechen, muss *Listeria* an Bereichen der Zellmembran adherieren, in denen E-cadherin für das Bakterium zugänglich ist. Nach Pentecost (2006) ist das in Bereichen, in denen einzelne Zellen aus dem epithelialen Zellverband hinausgedrängt werden und sich ablösen, möglich. Während dieses natürlichen Prozesses ist trans-monomeres E-cadherin für die Bindung von Internalin A verfügbar, so dass *Listeria* die dynamischen Erneuerungsmechanismen von Epithelzellen für eine Invasion ausnutzen kann.

In 4.3.4 wurde ein Technik entwickelt, die zum Nachweis der Endozytose von E-cadherin nach der Stimulation durch rekombinantes Internalin A, verwendet wurde. Dabei wurden adhärente Zellen mit Trypsin inkubiert. Trypsin führt daraufhin eine proteolytische Spaltung aller extrazellulären Proteindomänen durch, so dass E-cadherin im Western Blot nicht mehr bei seinem ursprünglichen Molekulargewicht detektiert wird (Abb. 2.20). Der extrazelluläre Verdau durch Trypsin bei Zellen, welche für 5 Minuten mit rekombinantem Internalin A stimuliert wurden, zeigt ein anderes Bild. Hier ist das Volllänge E-cadherin noch zu detektieren. Zumindest ein Teil der E-cadherin Population war also vor dem Verdau durch Trypsin geschützt. Dies lässt sich nur durch eine Endozytose von E-cadherin nach der Stimulation durch Internalin A erklären. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Stimulation von Epithel-Zellen durch rekombinantes Internalin A zu einer Endozytose von E-cadherin führen kann. Die Dauer des Vorgangs entspricht mit 5 Minuten der Dauer ähnlicher Mechanismen wie der Endozytose des Met-Rezepors (Taher et al., 2002). Weiterhin wird durch das Ergebnis deutlich, dass die Funktion von Internalin A nicht nur die Adhäsion des Bakteriums an die Wirtszelle sein kann, sondern dass entweder die

Bindung von Internalin A an E-cadherin zelluläre Signal-Prozesse auslösen muss, oder ein anderer Rezeptor für Internalin A auf der Zelle existiert, welcher über einen bisher nicht mit *Listeria* in Zusammenhang gebrachten Mechanismus die Endozytose von E-cadherin induziert.

Sousa et al. (2007) konnte zeigen, dass bereits 2 Minuten nach einer Internalin A-abhängigen Infektion von *Listeria monocytogenes* in Caco-2 Zellen eine Phosphorylierung der Kinase Src an Tyrosin 418 zu beobachten ist. Diese Phosphorylierung ist gleichbedeutend mit einer Aktivierung der Src-Kinase. Eine Inhibition von Src durch den spezifischen Inhibitor 4-Amino-5-(4-methylphenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine (PP1) resultierte in einer reduzierten Effizienz der InlA-abhängigen Invasion von *Listeria*. Die Autoren führen die Reduktion der Internalin A-abhängigen Invasionseffizienz darauf zurück, dass ein zelluläres Zielprotein von Src - das bei der dynamischen Regulierung des Zytoskeletts notwendige Protein Cortactin - nach Src-Inhibition nicht mehr durch Src phosphoryliert werden kann. Allerdings veränderte sich der Phosphorylierungsgrad von Cortactin während der Internalin A-abhängigen Infektion durch *Listeria* in Caco-2 Zellen nach nicht, was bei dem von den Autoren vorgeschlagenen Mechanismus zu erwarten gewesen wäre.

Aktive Src-Kinase kann - wie Fujita et al. (2002) zeigte - allerdings auch die Endozytose von E-cadherin durch eine Phosphorylierung der Membran-nahen intrazellulären Region einleiten. Es wäre also ein Mechanismus denkbar, bei dem die Bindung von Internalin A an E-cadherin oder ein anderes Oberflächenprotein der Wirtszelle eine Aktivierung von Src und so die Phosphorylierung von E-cadherin induziert. Die Phosphorylierung führt zu einer Ubiquitinierung von E-cadherin und schließlich zum Abbau des E-cadherin Proteinkomplexes. Die Freisetzung von β -catenin aus dem Komplex führt zu einer Phosphorylierung von β -catenin und schließlich zur Degradation des Proteins. Unter physiologischen Bedingungen könnte die Aktivierung des c-Met Signalweges durch die Bindung von Internalin B an Met diesen Prozess verstärken, da die Aktivierung von c-Met eine Aktivierung von Src nach sich zieht (Faletto et al., 1993). Zusätzlich kann die Bindung von Internalin B an c-Met einen positiven Effekt auf die Zugänglichkeit von E-cadherin-Molekülen für *Listeria* haben, da die Stimulierung der Rezeptortyrosinkinase c-Met durch Internalin

B zu einem Abbau von Zell-Zell-Kontakten und erhöhter Motilität (Morimoto, 1991) der Zelle führt.

5.3.1 Die Phosphorylierung von E-cadherin an Tyrosin 753 durch Src

In dem Fall, dass die Bindung von Internalin A an E-cadherin zu einer aktiven Endozytose des E-cadherin Komplexes führt, sind Veränderungen in der Zusammensetzung des E-cadherin Komplexes wahrscheinlich. Diese Veränderungen werden in der Zelle durch die Phosphorylierung von Proteinen gesteuert. Abhängig davon an welcher Stelle ein Protein phosphoryliert wird, kann dieser Vorgang Einfluss auf die sterische Konformation, Bindungspartner, die Aktivität oder die Lokalisation des Proteins haben. Fujita et al. (2002) konnte zeigen, dass die Phosphorylierung von E-cadherin an der intrazellulären Domäne von E-cadherin zu einer Rekrutierung des Proteins Hakai führt. Hakai hat die Funktion einer Ubiquitin-Ligase, modifiziert das Zielprotein also durch die kovalente Verknüpfung von Lysin-Resten des Zielproteins mit dem kleinen globulären Protein Ubiquitin. Die Ubiquitinierung von Proteinen zieht für zytosolische Proteine eine Degradation durch das Proteasom nach sich, während Membran-gebundene Proteine über einen Clathrin-vermittelten Prozess (Übersicht von Kaksonen et al., 2006) endozytiert werden. Damit ist die Phosphorylierung von E-cadherin das Ereignis, welches zu einer Endozytose des Adhäsionsproteins führt. Fujita et al. (2002) konnten die Phosphorylierungsstelle auf die Aminosäuren Y753 und Y754 eingrenzen. Die Kinase, welche diese Phosphorylierung durchführt, ist unbekannt, doch konnten die Autoren nach einer Stimulation des Met-Signalweges durch HGF eine Rekrutierung von Hakai in den E-cadherin Komplex detektieren. Eine Temperatur-abhängige konstitutive Aktivierung der transfizierten Kinase v-Src bewirkte ebenfalls die Rekrutierung von Hakai. Zusammen mit der durch Sousa (2007) nachgewiesenen Internalin A abhängigen Aktivierung von Src bei einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* zeigt dies, dass Src wahrscheinlich für die Endozytose-auslösende Phosphorylierung von E-cadherin verantwortlich ist. In 4.3.3 konnte in einem *in vitro* Experiment ein synthetisches und zur relevanten Region in E-cadherin korrespondierendes Peptid durch Src phosphoryliert werden und die Src-abhängige Phosphorylierungsstelle in E-cadherin lokalisiert werden. Das Experiment zeigt mit

überraschender Eindeutigkeit, dass das erste der drei aufeinanderfolgenden Tyrosine (Y753) dasjenige ist, welches durch Src phosphoryliert wird.

Da die Aminosäure Y753 als Phosphorylierungsstelle in E-cadherin in einem *in vitro*-Experiment bestimmt wurde, musste zunächst überprüft werden, ob diese Phosphorylierung auch in lebenden Zellen nachweisbar ist und ob auch Volllänge E-cadherin sich durch Src phosphorylieren lässt. Dazu wurde in Zusammenarbeit mit Christian Erk (HZI Braunschweig, Zellbiologie) ein monoklonaler Antikörper generiert, der ausschließlich die an Y753 phosphorylierte Form von E-cadherin detektieren kann. Zur Überprüfung, ob der Antikörper phosphoryliertes Volllänge E-cadherin detektieren kann, wurde eine Immunopräzipitation von E-cadherin aus einem MCF-7 Zelllysats durchgeführt, das Immunopräzipitat durch rekombinante Src-Kinase phosphoryliert und sowohl ein ELISA-Test als auch ein Western Blot durchgeführt. Beide Ergebnisse zeigten, dass der Antikörper an Y753 phosphoryliertes E-cadherin detektiert, wobei Kinase-freie Ansätze nur eine schwache oder keine Detektion zeigten. Das bedeutet zum einen, dass der generierte phosphospezifische Antikörper das Zielprotein in nativen wie auch im denaturierten Zustand erkennen kann, zum anderen bedeuten die Ergebnisse, dass Src dazu in der Lage ist, natives E-cadherin an Y753 zu phosphorylieren.

Trotz dieser Ergebnisse ist jedoch nicht davon auszugehen, dass Src die einzige Kinase ist, welche E-cadherin an Y753 phosphorylieren kann. Vielmehr ist anzunehmen, dass andere Kinasen der Src-Familie und auch Rezeptor-Tyrosinkinasen dazu in der Lage sind. Ein experimentelles Konzept, welches 2004 von Maly et al. publiziert wurde, ermöglicht eine für eine Phosphorylierungsstelle spezifische kovalente Verknüpfung von Kinase und Substrat. Die Aminosäure des Peptids, welches durch eine unbekannte Kinase phosphoryliert wird, wird durch ein Cystein substituiert und das Peptid immobilisiert. Neben verschiedener Kinasen, die für diese Phosphorylierungsstelle in Frage kommen, wird statt ATP ein „Cross Linker“ zugegeben. Er interagiert mit der ATP-bindenden Domäne der Kinase. Gelangt der „Cross-Linker“ in räumliche Nähe zum reaktiven Schwefelatom des substituierten Cysteins am Substratpeptid, entsteht zwischen dem Schwefel und dem katalytischen Lysin in der ATP-Bindungsdomäne der Kinase eine kovalente Bindung (Abb. 5.2).

Auf diese Weise ließe sich durch einen chromatographischen Schritt die Kinase einer bekannten Phosphorylierungsstelle anreichern und anschließend identifizieren.

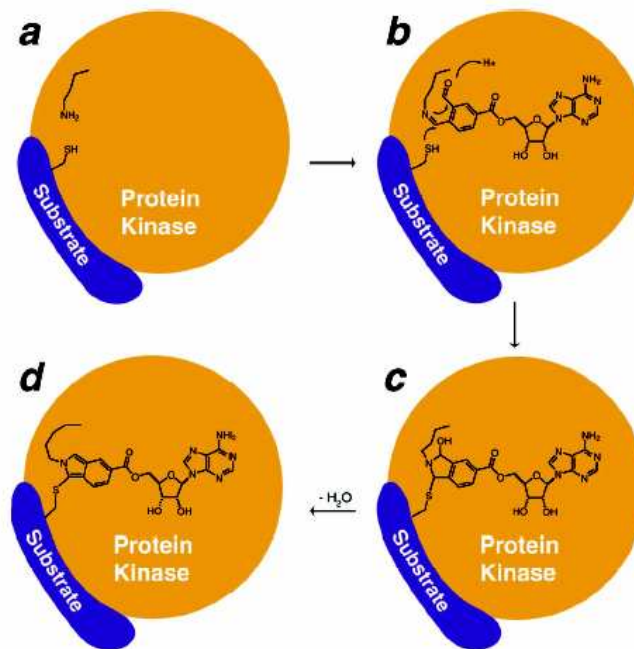


Abb. 5.2 Schematische Darstellung der „Cross-linking“-Reaktion von Kinase und substituiertem Substrat. a) Die phosphorylierte Aminosäure des Substrats wird durch Cystein ersetzt. Lysin im katalytischem Zentrum der Kinase gelangt in räumliche Nähe zur SH-Gruppe des Cysteins. b) und c) Der „Cross-Linker“ verknüpft Kinase und Substrat covalent miteinander d) (Quelle: Maly et al., 2004).

Zur Validierung eines solchen Reaktionsansatzes ließe sich das Peptid mit einem Biotin markieren. Die Verknüpfung von Kinase und Substrat sollte sich dann immunologisch durch einen gegen Biotin gerichteten Antikörper detektieren lassen.

Abbildung 5.3 zeigt ein vorläufiges Ergebnis zur kovalenten Verknüpfung von Src und der zu E-cadherin korrespondierenden Peptidsequenz um Y753, welches selbst durch ein Cystein substituiert und mit einem Biotin markiert wurde. Der Biotin-Antikörper erzeugt im Western Blot ein Signal bei >100 kDa, während ein Src Antikörper ein Signal bei 100 kDa liefert. Die Kinase wurde also kovalent mit dem biotinylierten Peptid verknüpft und ist deshalb mit dem Biotin Antikörper detektierbar.

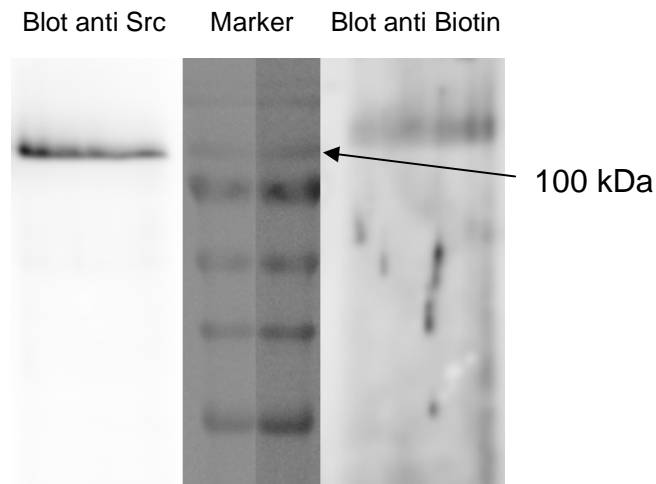


Abb. 5.3 Kovalente Verknüpfung von Src und biotinyliertem Substrat Peptid Rekombinante c-Src Kinase wurde mit dem aus E-cadherin abgeleiteten Peptid DNV C YYDEEGGGEEDQDFDLSQLHR-biotin und dem ATP-Analogon ADOPA inkubiert. Die kovalente Verknüpfung zwischen Kinase und dem Cystein im Peptid lässt sich im Western Blot gegen Biotin nach denaturierendem SDS-Page nachweisen.

Die Anwendbarkeit dieser Methode zur kovalenten Verknüpfung von Substrat und Kinase konnte in einem Vorexperiment nachgewiesen werden und zeigt so durch einen alternativen Ansatz die Phosphorylierung von dem von E-cadherin abgeleiteten Peptid durch die Kinase Src. Jedoch wurde bisher keine chromatographische, substratspezifische Anreicherung von Kinasen durchgeführt um weitere Kinasen, welche dieselbe Aminosäuresequenz erkennen, zu identifizieren.

5.3.2 Die Phosphorylierung von Komponenten des E-cadherin Komplexes nach Internalin A Stimulation

Zur Untersuchung, ob Internalin A die Zusammensetzung und den Status der Phosphorylierung einiger Komponenten des E-cadherin Komplexes beeinflussen kann, wurden MCF7 Zellen mit rekombinantem Internalin A für verschiedene Zeiträume inkubiert. Die Abbildungen 2.21 und 2.23 zeigen, dass bereits nach 5 Minuten eine signifikante Zunahme von an Y753 phosphoryliertem E-cadherin bzw. an S45 phosphoryliertem β -catenin zu beobachten ist. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Bindung von Internalin A an E-cadherin oder ein anderes Membranprotein von MCF7-Zellen eine Aktivierung von Src oder einer anderen

Kinase bewirkt, die E-cadherin an Y753 phosphorylieren kann. Dies bewirkt eine Destabilisierung des E-cadherin Komplexes in dessen Verlauf β -catenin in das Zytosol entlassen wird. Dort oder noch im E-cadherin-Komplex findet eine schnelle Phosphorylierung von β -catenin und damit die Markierung zur anschließenden Degradation des Proteins statt. Während die erste Phosphorylierung von E-cadherin ein primäres Resultat der Internalin A Stimulation ist, hat die Phosphorylierung von β -catenin den Charakter eines Sekundäreffektes und ist vermutlich nicht direkt durch die Internalin A Bindung gesteuert, sondern ein Resultat der Endozytose von E-cadherin.

β -catenin kann im E-cadherin Komplex durch γ -catenin substituiert sein. β - und γ -catenin weisen nahezu identische Sequenzen am N-terminus auf. Serin 45 in β -catenin entspricht Serin 35 in γ -catenin. Da für die Erzeugung des verwendeten phosphospezifischen Antikörpers (Sigma-Aldrich) die Sequenz G38 bis G50 verwendet wurde und die sich nur unwesentlich von der analogen Sequenz in γ -catenin unterscheidet, ist eine Kreuzreaktion des phosphospezifischen Antikörpers mit γ -catenin denkbar.

β -catenin:	DSGIHS GATTAPSLSGKG NP
γ -catenin:	DSGIHS GANTCVPSVSSKG IM

Abbildung 5.4 zeigt eine Immunodetektion von pS45 β -catenin nach einer Stimulation durch Internalin A für 5 Minuten in einem Immunopräzipitat von E-cadherin, verglichen mit einer nicht stimulierten Probe. Während sich beim Phospho- β -catenin-Signal im Immunopräzipitat keine Unterschiede detektieren ließen, zeigte sich bei einem Molekulargewicht von 70 kDa nach Stimulation eine Bande (Pfeil). Dagegen war das Protein im nachgefärbten Gel in beiden Proben gleich stark präsent (nicht gezeigt). Mittels Massenspektrometrie wurde das Protein als γ -catenin identifiziert.

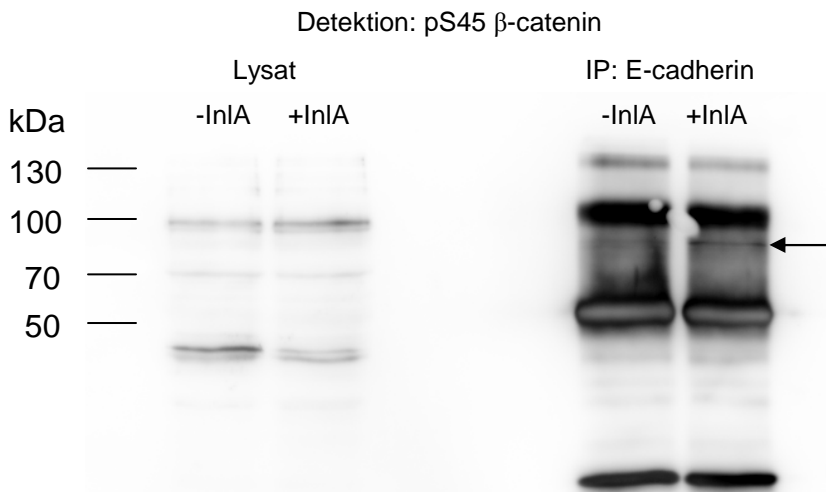


Abb 5.4 Phosphorylierung von β -catenin und γ -catenin nach Internalin A Stimulation Caco-2 Zellen wurden 5 Minuten mit Internalin A stimuliert. Im Lysat (links) ist die verstärkte Phosphorylierung von β -catenin und im E-cadherin Immunopräzipitat (rechts) einer weiteren Bande zu erkennen. Das Protein wurde massenspektrometrisch als γ -catenin identifiziert.

Es kann also davon ausgegangen werden, dass auch γ -catenin in E-cadherin Komplexen, in denen es β -catenin substituiert, nach einer Internalin A Stimulation phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung von γ -catenin wurde in einem Immunopräzipitat nachgewiesen, so dass γ -catenin zum Zeitpunkt der Phosphorylierung noch an E-cadherin assoziiert gewesen sein muss. Diese Beobachtung steht im Einklang mit einer Arbeit von Miravet et al. (2003), in der gezeigt wurde, dass die Phosphorylierung von γ -catenin durch die Tyrosinkinasen Fer und Src den gegenteiligen Effekt - nämlich eine Stärkung der Assoziation zum E-cadherin Komplex - haben, als die Phosphorylierung von β -catenin durch die Kinasen Fer und Src - den Verlust der Bindung zu α -catenin und E-cadherin. Die Frage nach der Lokalisation von β - und γ -catenin zum Zeitpunkt der Phosphorylierung an S45 bzw. S35 ist jedoch nicht abschließend geklärt.

Diese Ergebnisse zur Stimulation von MCF7 und Caco-2 Zellen legen nahe, dass *Listeria monocytogenes* bei der Internalin A abhängigen Invasion den natürlichen Endozytose-Prozess des Adhäsionsproteins E-cadherin nicht nur ausnutzt, sondern diesen Prozess gezielt einleiten kann. Dabei wird durch einen noch unbekannten Mechanismus die Phosphorylierung von E-cadherin bewirkt und so die Endozytose ermöglicht. Unter physiologischen Bedingungen ist es denkbar, dass die Aktivierung

von Src und die Zugänglichkeit von E-cadherin für Internalin A durch die Internalin B vermittelte Aktivierung von c-Met noch verstärkt wird.

Yamada et al. (2005) konnte durch FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) zeigen, dass die Halbwertszeit von nicht trans-dimerisiertem E-cadherin an Zelloberflächen bei 0,54 Minuten liegt. Gleichzeitig ist dieses „mobile“ E-cadherin nicht mit dem Aktin-Zytoskellett assoziiert. Demnach findet eine schnelle, Aktin-unabhängige Endozytose von E-cadherin statt. Dabei ist allerdings davon auszugehen, dass auf diesen Prozess nicht die Degradation des Proteins im Lysosom folgt, sondern eine Rückführung von E-cadherin an die Plasmamembran (Paterson et al., 2003). Dieses „Recycling“ von E-cadherin findet ohne eine Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen statt und wird durch die kleine GTPase Rab11 reguliert (Lock et al., 2005). Da hier gezeigt werden konnte, dass die Stimulation von MCF7-Zellen mit rekombinantem Internalin A eine Phosphorylierung von E-cadherin selbst und anderen Komponenten des E-cadherin Komplexes nach sich zieht, ist davon auszugehen, dass das „mobile“ E-cadherin aus dem oben beschriebenen „Recycling“-Mechanismus nicht durch *Listeria* zur Invasion ausgenutzt wird.

Während des Übergangs von epithelialen Zellen zu migrationsfähigen Zellen (EMT, „Epithelial to Mesenchymal Transition“), welcher durch HGF stimuliert werden kann, wird E-cadherin transkriptionell (Huber et al., 2005) herunterreguliert und Zell-Zell-Kontakte gehen verloren. Die Aktivierung von Src bewirkt eine Clathrin-vermittelte Endozytose in deren Verlauf p120- und β -catenin phosphoryliert werden und die Bindung zu E-cadherin verlieren. Die hier nachgewiesenen Phosphorylierungen an E-cadherin und β - bzw. γ -catenin deuten darauf hin, dass die Bindung von Internalin A an E-cadherin den Endozytose-Prozess auslöst, welcher zu einer Degradation von E-cadherin im Lysosom führt.

5.3.3 Die Rolle von Hakai, Proteasom und Lysosom bei der Invasion durch *Listeria monocytogenes*

Die Behandlung von Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 bewirkt, dass Zellen auch nach HGF-Stimulation ihren epithelialen Phänotyp beibehalten anstatt voneinander zu dissoziieren (Tsukamoto und Nigam, 1999). Weiterhin wurde beobachtet, dass in MG132 behandelten Zellen die Dynamik im Umsatz von E-cadherin reduziert war, also weniger Degradation von E-cadherin stattfand. Die Autoren führten diesen Umstand auf einen Proteasom-abhängigen Schritt bei der HGF oder Src induzierten Dissoziation der Zellen zurück. Im Falle des Interleukin-2 Rezeptor Komplexes konnte ein ähnlicher Effekt festgestellt werden (Yu et al., 2001). Während der ersten 15 Minuten des Endozytosevorgangs hatte MG132 keinen signifikanten Einfluss auf die Endozytose von Interleukin-2. Jedoch stoppt 30 Minuten nach Stimulation die Endozytose von Interleukin-2, während in unbehandelten Zellen die Endozytose anhält. Interleukin-2 wird zur Degradation im Lysosom monoubiquitiniert und nicht durch das durch MG132 blockierte Proteasom abgebaut. So ist anzunehmen, dass das Proteasom bei einem Schritt der Umwandlung vom Endosom in Lysosom eine entscheidende noch unbekannte Rolle spielt.

In 4.3.2 konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von MCF7 Zellen mit MG132 zu einer weniger effizienten Invasion durch *Listeria monocytogenes* führt. Derselbe Effekt konnte sowohl bei der Internalin A als auch bei der Internalin B abhängigen Invasion von *Listeria* beobachtet werden. Zur Zeit gibt es keine Hinweise darauf, dass ein funktionelles Proteasom bei den Recycling-Mechanismen der Rezeptoren E-cadherin und c-Met notwendig ist. Unter diesen Voraussetzungen zeigt die Reduktion der Invasionseffizienz von *Listeria monocytogenes* nach Proteasom-Inhibition, dass das Bakterium zelluläre Degradationsprozesse für seine Aufnahme in die Wirtszelle ausnutzt. Die Inhibition des Proteasomes durch MG132 hat offenbar keine Auswirkungen auf die initialen Endozytose-Vorgänge in Zellen (Yu et al., 2001). Dennoch scheint die Anreicherung von ubiquitinierten Proteinen sich negativ auf die anhaltende Endozytose von Oberflächenproteinen auszuwirken. Ursache dafür wäre eine mögliche Beteiligung des Proteasoms bei der Umwandlung von Endosomen in Lysosomen. Dies könnte zu einer Art Rückstau bei der Endozytose

von Proteinen und damit auch von Listerien führen. Ein solcher Effekt würde sich auf die verwendeten Deletionsmutanten von Internalin A bzw. B ebenso auswirken wie auf Listerien vom Wildtyp. Die experimentellen Ergebnisse stehen mit dieser Vermutung im Einklang.

Die Infektions-Experimente in denen MCF7 Zellen verwendet wurden, in welchen die Expression von Hakai mittels RNA-Interferenz reduziert wurde, zeigten, dass die Invasionseffizienz von *Listeria* in diesen Zellen erheblich reduziert ist. Gleiches konnte in Deletionsmutanten für Internalin A und Internalin B beobachtet werden. Die Ergebnisse mit dem Wildtyp zeigen, dass die Ubiquitin Ligase Hakai für eine effektive Invasion durch *Listeria monocytogenes* notwendig ist. Die Ubiquitinierung von E-cadherin ist das Signal für eine Clathrin-vermittelte Endozytose des E-cadherin Protein-Komplexes und einer darauffolgenden Degradation im Lysosom. Das Pathogen bedient sich demnach genau des Mechanismus, welcher bei der Degradation von E-cadherin zum Einsatz kommt.

Im Falle des Fehlens von Internalin A können die Bakterien weniger gut an der Wirtszelle haften, so dass die beobachtete Reduktion der Invasion auch so erklärbar wäre. Die Reduktion der Invasionseffizienz in Hakai „Knock-down“- Zellen mit *inlA* defizienten Listerien ist unerwartet, da bisher nicht bekannt ist, ob Hakai für die Endozytose von c-Met benötigt wird und c-Cbl als die Endozytose einleitende Ubiquitin-Ligase beschrieben wurde. E-cadherin und c-Met kommen in Zell-Zell-Kontakten allerdings in sogenannten „Lipid rafts“ vor (Nusrat et al., 2000). In diesen Lipid-reichen Membranbereichen sind Rezeptor- und Adhäsions-Moleküle angereicht, was sie zu Zonen erhöhter Signalweiterleitung macht. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Clathrin vermittelte Endozytose von Membran-Proteinen effizienter abläuft, wenn sie Bestandteil von „Lipid rafts“ sind (Rollason et al., 2007).

Kamei et al. (1999) zeigten, dass die Endo- und Exozytose von E-cadherin und c-Met in Zell-Zell-Kontakten zeitlich gleich ablaufen, so dass anzunehmen ist, dass beide Mechanismen miteinander verschränkt sind, obwohl unterschiedliche Komponenten für die jeweiligen Endozytose-Prozesse rekrutiert werden.

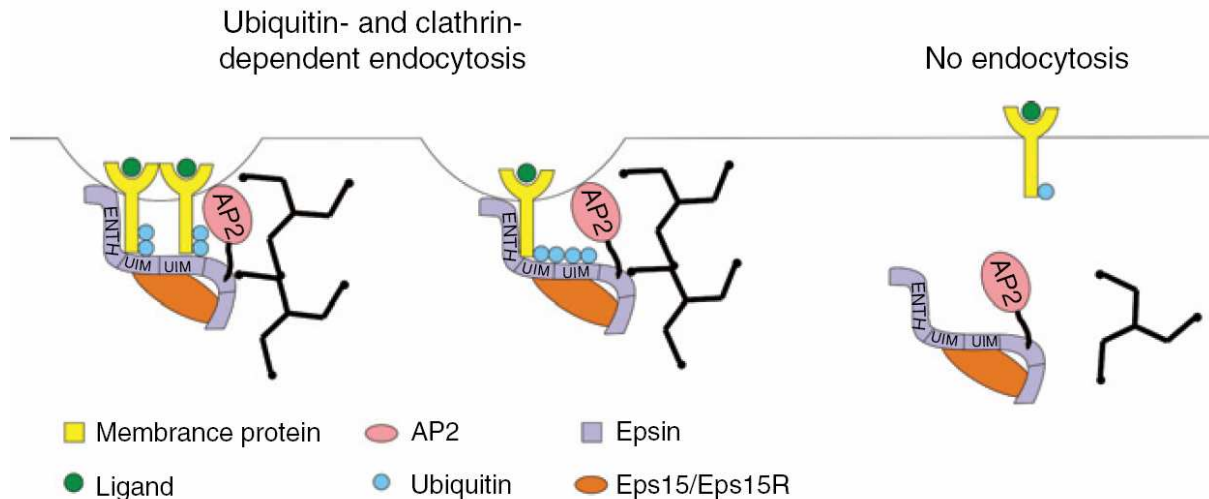


Abb. 5.5 Bildung des Endozytose-Komplexes monoubiquitinierte Proteine Für eine effektive Endozytose ubiquitinierte Membranproteine wird eine Monoubiquitinierung mehrerer Proteine oder eine Polyubiquitinierung eines Proteins benötigt (Quelle: Madhus, Traffic 2006).

Inwiefern eine einzelne Ubiquitinierung für die Einleitung der Endozytose von Membranproteinen ausreichend ist, wurde von Madhus diskutiert (2006). In mehreren Arbeiten konnte demnach gezeigt werden, dass die Monoubiquitinierung nicht ausreichend ist, um eine für die Endozytose ausreichend starke Interaktion zwischen dem ubiquitinierten Protein und Clathrin-Adaptoren wie Epsin herzustellen (Abb. 5.5). Es ist daher anzunehmen, dass zur Endozytose von in Lipid rafts angereicherten Proteinen gleich mehrere dieser Proteine ubiquitiniert werden müssen, um eine effektive Endozytose einzuleiten. Im Fall der Endozytose von c-Met wurde als Ubiquitin-Ligase c-Cbl identifiziert (Taher et al., 2002), während bei E-cadherin Hakai für die Modifikation verantwortlich. Seveau et al. (2004) konnte zeigen, dass sowohl für die Internalin A wie auch für die Internalin B abhängige Aufnahme von *Listeria monocytogenes* intakte „Lipid rafts“ notwendig sind. Ähnliches ist auch für andere Pathogene wie *Salmonella*, *Chlamydia* oder *Shigella* (Gatfield and Pieters, 2000; Shin et al., 2000; Garner et al., 2002; Lafont et al., 2002; Jutras et al., 2003) bekannt. Somit ist eine verminderte Aufnahme von Listerien, welche kein Internalin A exprimieren auch in Hakai „Knock-down“-Zellen mit einer möglichen Verschränkung der Endozytose-Mechanismen von E-cadherin und c-Met zu erklären. Auch wenn sowohl Internalin A als auch Internalin B zur Einleitung der Endozytose hinreichend sind, ist hier ein möglicher synergistischer Effekt zwischen beiden Internalinen zu vermuten. Für die genaue Charakterisierung solcher Effekte sind weitere Untersuchungen notwendig.

5.3.4 Modell der InlA vermittelten Invasion von *Listeria monocytogenes*

Aus den in dieser Studie resultierenden Erkenntnissen zur Endozytose von E-cadherin, der Phosphorylierung von Komponenten des E-cadherin Komplexes und Infektionsversuchen lässt sich ein neues Modell für die molekularen Prozesse auf der Wirtsseite bei der Invasion von *Listeria monocytogenes* ableiten. Die Invasion von *Listeria* findet an Darmzotten in Bereichen statt, in denen sich aufgrund natürlicher Erneuerungsprozesse Zellen aus dem epithelialen Verbund gelöst haben und ehemalige Zell-Zell-Kontaktbereiche für das Bakterium frei zugänglich werden. Diese Zell-Zell-Kontaktbereiche sind in Lipid-reichen Strukturen organisiert, welche als Einheiten in der Zellmembran schwimmen und als „Lipid rafts“ bezeichnet werden. Ein weiteres Merkmal dieser Strukturen ist die Anwesenheit von E-cadherin und c-Met. *Listeria* bindet mit dem Oberflächenprotein Internalin A an freie trans-monomere E-cadherin Komplexe, während Internalin B an c-Met bindet. Letztere Bindung löst eine Aktivierung des c-Met Signalweges aus, was unter anderem zu einer Aktivierung der Kinase Src führt. Die Bindung von Internalin A an E-cadherin oder ein anderes bisher nicht identifiziertes Oberflächenprotein der Wirtszelle führt ebenfalls zu einer Aktivierung von Src. Src phosphoryliert E-cadherin an Y753, was zu einer Dissoziation des Proteins p120 catenin vom Membran-nahen intrazellulären Bereich von E-cadherin führt. Weiterhin phosphoryliert Src das Protein β -catenin an Y654, was zu einer Dissoziation von β -catenin von E-cadherin führt. Die weitere Phosphorylierung von β -catenin an Y142 verhindert die Bindung zu α -catenin, so dass β -catenin durch die Phosphorylierung an S45 durch Casein Kinase 1 für eine Degradation im Proteasom markiert wird und in das Zytosol freigesetzt wird. An das phosphorylierte E-cadherin lagert sich die Ubiquitin-Ligase Hakai an und synthetisiert einzelne Ubiquitin-Reste an die intrazelluläre Domäne von E-cadherin, während Cbl diese Modifikation nach Internalin B Stimulation an c-Met durchführt. Clathrin-Adaptoren wie Epsin und Eps15 gefolgt von Clathrin binden an die ubiquitinierten Proteine und bilden so ein Untergerüst aus Clathrin. Zusätzlich induziert Internalin B die lokale Reorganisation des Aktin Zytoskeletts, wodurch der über Adapter-Proteine an Aktin-Filamente gekoppelte Clathrin-Unterbau in das Zell-Innere gezogen wird (Abb. 5.6) und sich ein Clathrin-ummanteltes Vesikel (Kaksonen et al., 2006) bildet.

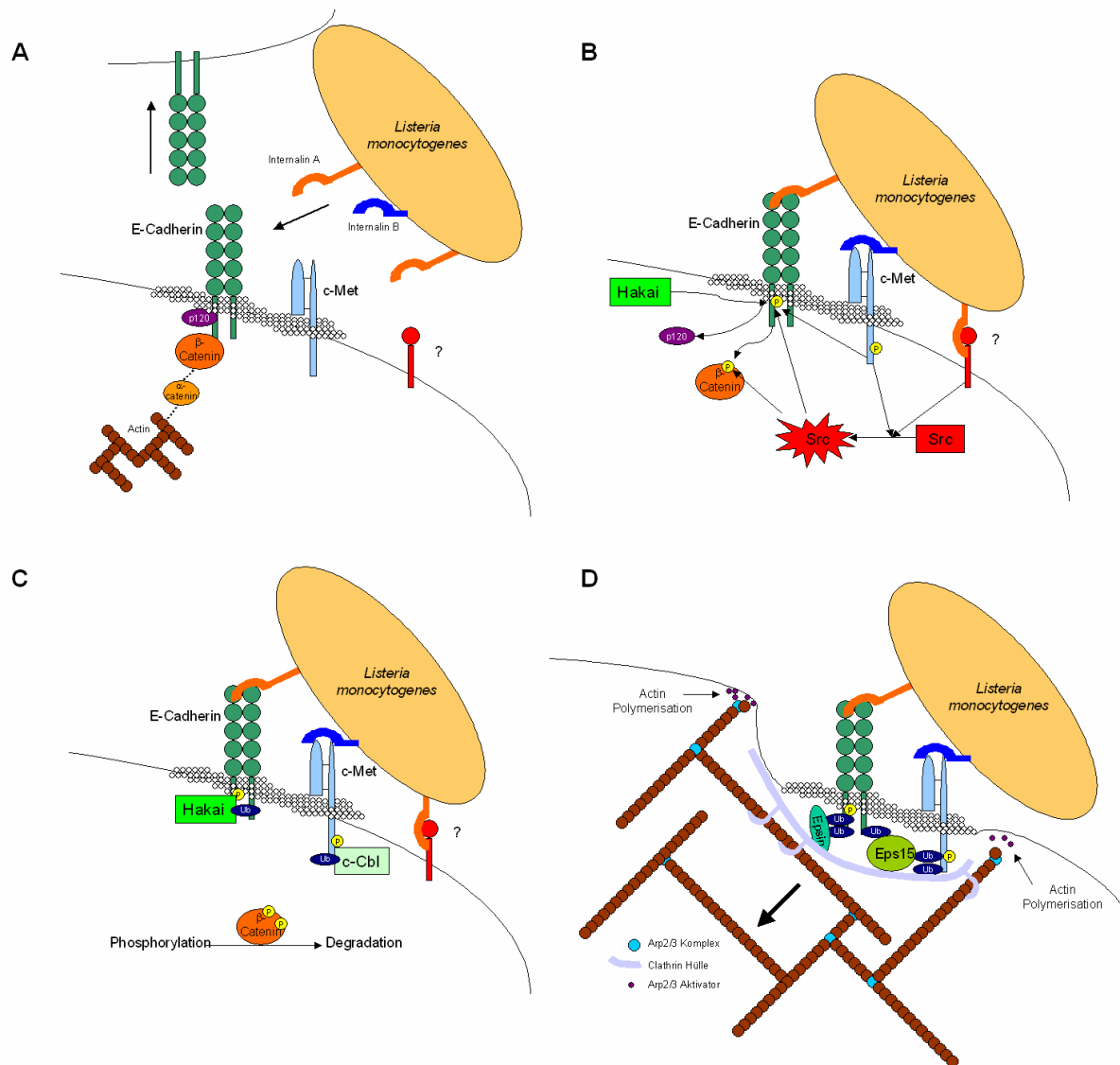


Abb. 5.6. Modell zur Endozytose von *Listeria monocytogenes* **A)** Bei der natürlichen Erneuerung von Darmepithelzellen werden ehemalige Bereiche von Aktin-assoziierten Zell-Zell-Kontakten („Lipid rafts“) für *Listeria* zugänglich. **B)** Die Bindung von Internalin B an c-Met aktiviert die Rezeptortyrosinkinase. E-cadherin wird durch c-Met oder Src an Y753 phosphoryliert, nachdem Src durch c-Met oder einen noch unbekannten Prozess aktiviert wird. Die Phosphorylierung von E-cadherin führt zur Rekrutierung von Hakai. **C)** Freigesetztes β-catenin wird phosphoryliert und degradiert, während Hakai und c-Cbl E-cadherin bzw. c-Met ubiquitinieren. **D)** Clathrin-Adapterproteine binden an Ubiquitin und rekrutieren Clathrin. Die Aktivierung von c-Met führt zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und das Bakterium wird aktiv in die Wirtszelle gezogen.

Die Beteiligung von Clathrin an der Internalin B vermittelten Endozytose von *Listeria* konnte von Veiga et al. (2005) nachgewiesen werden. In einer im Rahmen dieser Dissertation betreuten Studienarbeit (Sachs, 2007) konnte erste Hinweise für eine Assoziation von Clathrin an E-cadherin nach Internalin A Stimulation gefunden werden (Abb. 5.7. Dazu wurde eine durch Wollert et al. (2007) entwickelte Internalin

A Mutante verwendet, welche eine um den Faktor 6700 höhere Affinität im Vergleich zur normalen E-cadherin-Internalin A Interaktion aufweist. Mit diesem Protein wurden MCF7 Zellen stimuliert, lysiert und Internalin A durch Immunopräzipitation angereichert. Neben E-cadherin konnte Clathrin mittels Western Blot im Präzipitat detektiert werden, während es in einem direkten Immunopräzipitat von E-cadherin ohne vorherige Stimulation mit Internalin A abwesend war.

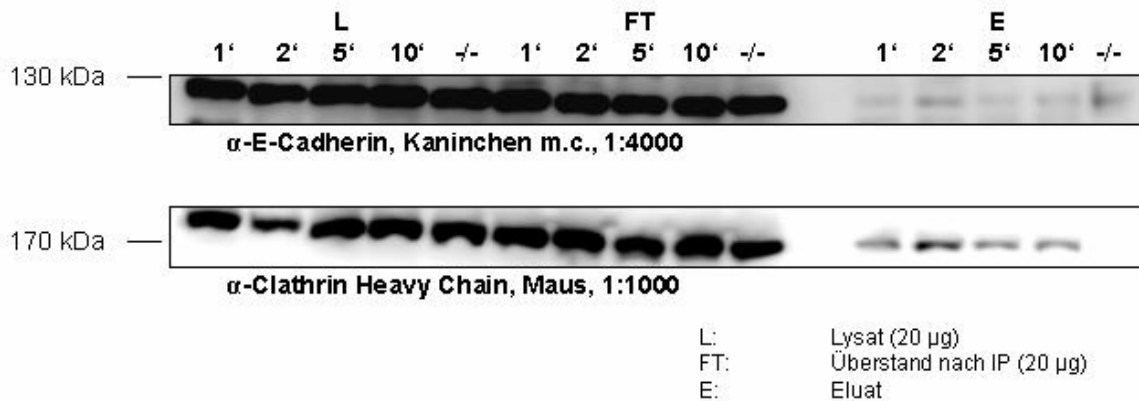


Abb. 5.7 Co-Präzipitation von E-cadherin und Clathrin durch Internalin A MCF7-Zellen wurden für 1, 2, 5 und 10 Minuten mit Internalin A stimuliert. Internalin A wurde immunopräzipitiert. Neben E-cadherin konnte die schwere Kette des Proteins Clathrin im Präzipitat nachgewiesen werden. Im direkten E-cadherin Immunopräzipitat (-/-) konnte kein Clathrin detektiert werden (Sachs, 2007).

In der Arbeit von Veiga et al. (2007) konnte eine Kolo-kalisation von Clathrin mit Listerien in Abhängigkeit von Internalin A gezeigt werden. Das von Sousa et al. (2005) vorgeschlagene Modell zur Internalin A vermittelten Endozytose von *Listeria* (Abb. 1.5) impliziert eine Rekrutierung von ARHGAP10, Vezatin und Myosin VIIA an den E-cadherin-Komplex als generellen Mechanismus, welcher im normalen Zell-Zell-Kontakt einen stetigen Zug auf die Nachbarzelle ausübt. Vezatin ist dabei an α -catenin assoziiert, welches im stabilen E-cadherin-Komplex allerdings nur quasistationär oder über Adapterproteine mit dem E-cadherin Komplex verbunden ist, da es nicht zeitgleich an β -catenin und Aktin binden kann. *Listeria* würde demnach durch einen Mechanismus nur als Fracht mit in die Zelle hineingezogen, der – da ohnehin permanent vorhanden – keine Weiterleitung von solchen Signalen benötigen würde, wie sie hier beobachtet wurden. Die Aktivierung von Src sowie die Phosphorylierungen an β -catenin und E-cadherin lassen sich mit dem Modell von Sousa nicht ausreichend erklären.

Da die Affinität von Internalin A zu E-cadherin nicht wesentlich größer ist, als die Affinität von E-cadherin zu E-cadherin, kann Internalin A nur an nicht trans-dimerisiertes E-cadherin binden. Diese Subspezies wird jedoch permanent in einem Recycling-Prozess endozytiert und erneut an Membranoberflächen präsentiert. Es wäre denkbar, dass nach der Bindung von Internalin A an dieses freie E-cadherin Vezatin, Myosin VIIA und ARHGAP10 rekrutiert werden und die dadurch aufgebaute Kraft, welche einen stetigen Zug auf die Nachbarzelle ausübt, zur Endozytose von *Listeria* führt. Demnach wäre das im Recycling-Prozess zirkulierende E-cadherin die für *Listeria* relevante Protein-Subspezies. Das widerspricht allerdings Veröffentlichungen, nach denen „Lipid rafts“ die Membranbereiche sind, über die sich *Listeria* sowohl Internalin A als auch Internalin B abhängig Eintritt in die Wirtszelle verschafft. Diese Theorie bezieht sich auf in Zell-Zell-Kontakten immobilisiertes E-cadherin. Weiterhin wurde gezeigt, dass der physiologische Eintrittsort von *Listeria* in die Wirtszelle die Zell-Ausstülpungen sind, welche bei der permanent stattfindenden Erneuerung von Zell-Zellkontakten entstehen (Pentecost et al., 2006). Bei diesem Prozess werden bestehende Zell-Zell-Kontakte aufgebrochen und die Komponenten für eine anschließende Degradation endozytiert. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass Proteine wie ARHGAP10 und Vezatin auch bei diesem Vorgang eine Rolle spielen.

Yang et al. (2006) konnte zeigen, dass die Ubiquitin Ligase MDM2 wie auch Hakai dazu in der Lage ist, E-cadherin zu ubiquitinieren. Weiterhin konnten die Autoren zeigen, dass die Inhibition des Proteasomes durch MG132 auch die MDM2-vermittelte Degradation von E-cadherin verhindert. Auch konnte polyubiquitiniertes E-cadherin an der Plasmamembran nachgewiesen werden. Demnach wäre MDM2 an einer Polyubiquitinierung von E-cadherin beteiligt, wodurch das Protein für eine Degradation durch das Proteasom markiert würde, welche sich durch die Inhibierung des Proteasomes durch MG132 unterbrechen ließe. Da auch die vorherige Behandlung von mit *Listeria* infizierten Zellen durch MG132 zu einer reduzierten Invasionseffizienz führte, kann auch eine Beteiligung von MDM2 und des Proteasomes an der Invasion von *Listeria monocytogenes* nicht ausgeschlossen werden. Die Beteiligung von Hakai und MDM2 an der Endozytose von E-cadherin deutet auf unterschiedliche Mechanismen der Endozytose von E-cadherin hin. Da sich in MDM2 im Gegensatz zu Hakai keine SH2-Domäne nachweisen lässt (Kussie

et al., 1996), ist eine Phosphorylierungs-abhängige Endozytose durch die Rekrutierung von MDM2 an E-cadherin unwahrscheinlich. Es wäre also denkbar, dass die MDM2-abhängige Endozytose von E-cadherin in Fällen der permanenten Erneuerung von E-cadherin-basierenden Zell-Kontakten eine Rolle spielt, wogegen Hakai speziell nach Ereignissen, die ein Signal an die Zelle erzeugen, phosphorylierungs-abhängig in den E-cadherin Komplex rekrutiert wird.

6. Zusammenfassung

Das humanpathogene Gram-positive fakultativ intrazelluläre Bakterium *Listeria monocytogenes* induziert seine Aufnahme in Wirtszellen durch die Ausnutzung zellulärer Endozytose-Prozesse. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich im Besonderen mit den zellulären Mechanismen, welche durch die Bindung des listeriellen Virulenzfaktors Internalin A an das Adhäsionsprotein E-cadherin in menschlichen Epithelzellen eingeleitet werden und zur Endozytose von E-cadherin und des Bakterium führen.

Es konnte gezeigt werden, dass allein die Bindung von rekombinantem Internalin A an E-cadherin oder einen noch unbekannten alternativen Oberflächenrezeptor zu einer Phosphorylierung von Komponenten des E-cadherin Komplexes führt. Das Protein β -catenin wird 5 Minuten nach Beginn der Stimulation von Epithel-Zellen mit Internalin A an Serin 45 phosphoryliert, was zu einer Degradation von β -catenin durch das Proteasom führt und eine Destabilisierung des E-cadherin Komplexes vermuten lässt. Weiterhin konnte die Phosphorylierungsstelle, welche die Rekrutierung der Ubiquitin Ligase Hakai in den E-cadherin Komplex reguliert, durch massenspektrometrische Methoden identifiziert werden. Durch die Erzeugung eines phosphospezifischen Antikörpers gegen an Y753 phosphoryliertes E-cadherin konnte die Phosphorylierung von E-cadherin nach Internalin A Stimulation untersucht und bestätigt werden. Die Beteiligung und die Relevanz der E3-Ubiquitin-Ligase Hakai an der Endozytose von *Listeria* konnte in Infektionsexperimenten gezeigt werden. Demnach reduziert die Abwesenheit von Hakai die Invasionseffizienz von *Listeria* um mehr als 70%. Die Beobachtung, dass auch die Internalin B-abhängige Invasion von *Listeria* durch die Abwesenheit von Hakai negativ beeinflusst wird, deutet auf einen synergistischen Effekt zwischen Internalin A und B hin, welcher vermutlich auf die bereits bekannte Co-Endozytose von E-cadherin und c-Met in sogenannten „Lipid rafts“ beruht.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Unterbrechung der Aktivität des Proteasoms durch die Behandlung von Zellen mit MG-132 ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der listeriellen Invasionseffizienz führt. Demnach ist eine

unmittelbare Beteiligung des Proteasoms an der Endozytose von *Listeria* und der Zielproteine von Internalin A und B nicht auszuschließen. Gleichzeitig ist aber auch ein Arrest im generellen Ablauf endozytotischer Mechanismen als Ursache für die reduzierte Invasion von *Listeria* nach der Inhibition des Proteasoms denkbar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit führten zu einem neuen Modell für die Internalin A induzierte Aufnahme von *Listeria monocytogenes* in Epithelzellen, in dem zum ersten mal die durch das Protein Hakai induzierte Ubiquitinierung des Internalin A-Rezeptors E-cadherin mit der Invasion von *Listeria* in Zusammenhang gebracht wird.

Eine systematische Analyse von Internalin A induzierten Phosphorylierungsereignissen konnte eine Reihe weiterer Proteine ermitteln, welche auf der Wirtsseite für die Invasion von *Listeria* relevant sein könnten. Dabei sind Proteine von besonderem Interesse, welche beim Transport von Vesikeln und bei der Reorganisation des Zytoskelettes beteiligt sind. Bisher war unbekannt, dass *Listeria* bereits durch die Bindung von Internalin A auf zelluläre Transportprozesse Einfluss nehmen kann. Die genauen Mechanismen dieser Einflussnahme konnten in dieser Arbeit jedoch nicht adressiert werden.

In allen Teilbereichen dieser Arbeit konnten neuartige Analyseverfahren entwickelt und etabliert werden. Von besonderer Relevanz ist dabei die umfassende biochemische Charakterisierung der massenspektrometrischen Quantifizierung von Proteinen durch iTRAQ™. Die hier gezeigten Daten ermöglichen eine Intensitäts-abhängige Ermittlung von Regulationsfaktoren in iTRAQ™-markierten Proben durch die „Maximum Likelihood“-Methode. Diese Erkenntnisse sind nicht alleine für die vorliegende Arbeit von Relevanz, sondern dienen in zahlreichen anderen Projekten der statistischen Absicherung von ermittelten Regulationsfaktoren von Proteinen und posttranslationalen Modifikationen.

7. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich iTRAQ™ zur massenspektrometrischen Quantifizierung nicht nur von Proteinen, sondern auch von differentiellen Proteinphosphorylierungen eignet. Damit steht eine Hochdurchsatz-Methode zur Verfügung, die es erlaubt, zeitlich aufgelöste Signal-Transduktionsstudien durchzuführen. Eine spezifische Anreicherung von Kinasen nach einer Stimulation mit Internalin A und eine darauffolgende Anreicherung der phosphorylierten Peptide solcher Kinasen, kombiniert mit einer quantitativen Analyse durch iTRAQ™ würde eine direkte und zeitlich aufgelöste Analyse des Aktivitätsstatus identifizierter Kinasen ermöglichen, sofern die Phosphorylierungsstellen, welche die Aktivität regulieren, bekannt sind. Weiterhin könnten durch eine solche Analyse regulierte Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, welche bisher uncharakterisiert sind. Ein derartiges Konzept wird zur Zeit auf Internalin B und HGF-induzierte Phosphorylierungen in Kinasen von Tobias Reinl (HZI Braunschweig, Proteomgruppe) angewendet und konnte bereits die Beteiligung von Kinasen im c-Met Signalweg nachweisen, welche bisher nicht in Zusammenhang mit einer Aktivierung von c-Met gebracht wurden. Da in dieser Arbeit bereits Hinweise auf Veränderungen im Phosphoproteom von Epithelzellen nach Internalin A Stimulation gefunden wurden, könnte die Identifizierung aktivierter Kinasen unmittelbar zur Aufklärung der Internalin A vermittelten Signaltransduktion beitragen.

Von zentraler Bedeutung bei der Internalin A vermittelten Endozytose von *Listeria monocytogenes* ist der bisher unbekannte Mechanismus der Src-Aktivierung nach Internalin A Stimulation. Auch wenn nicht ausgeschlossen werden kann, dass Internalin A an einen bisher nicht identifizierten zweiten Rezeptor auf der Membranoberfläche der Wirtszelle binden kann und über einen unbekannten Weg die Src-Aktivierung auslöst, so wäre auch eine Aktivierung durch die bekannte Interaktion von Internalin A mit E-cadherin denkbar. Die Prozesse, die zu einer Aktivierung von Src und der darauffolgenden Phosphorylierung von E-cadherin führen, sollten im Fokus nachfolgender Arbeiten zu Internalin A induzierten Signal-Transduktion stehen. Die generellen Mechanismen, welche zum Auf- und Abbau von Zell-Zell-Verbindungen führen, sind bisher in weiten Bereichen noch unbekannt, so

dass die Erstellung eines Profils aktiver Kinasen nach Internalin A Stimulation wichtige Erkenntnisse über die grundlegenden Mechanismen in Zellkontakten liefern könnte. Die bereits gewonnenen Erkenntnisse zur Src abhängigen Phosphorylierung von E-cadherin sind möglicherweise bei der Krebs-Diagnostik von Interesse.

Neben der Phosphorylierung spielt auch die Ubiquitinierung von Proteinen eine wichtige Rolle bei Signal-Transduktionsprozessen. Deshalb sollte die Entwicklung eines massenspektrometrischen Nachweisverfahrens der Ubiquitinierung ein Ziel bei der Etablierung neuer Technologien sein. Die Identifikation der Lysine, welche in Proteinen ubiquitiniert werden, trägt wahrscheinlich im gleichen Maße zum Verständnis von Signalwegen bei wie die Kenntnis von Phosphorylierungsstellen. In diesem Zusammenhang sollte auch die Rolle der Ubiquitin-Ligasen und die Art der Ubiquitinierung in der Signaltransduktion adressiert werden.

Die mögliche Beteiligung des Proteasoms an der Endozytose von *Listeria* sollte ebenfalls in weiteren Untersuchungen geklärt werden. So sind die molekularen Abläufe während der Endozytose von E-cadherin und c-Met noch nicht in dem Maße bekannt, um eine direkte Beteiligung des Proteasoms auszuschließen. Ebenfalls ist die Art der Ubiquitinierung, die zur Endozytose von E-cadherin und c-Met führt, nicht eindeutig aufgeklärt und sollte somit Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Ein anderer interessanter Aspekt bei der Endozytose von *Listeria* wäre die Frage, ob die spezifische Inhibition des Lysosomes z.B. durch Chloroquin auch zu einer verminderten Invasionseffizienz von *Listeria* führt. Generell ist diese Fragestellung natürlich auch bei anderen intrazellulären Pathogenen von Interesse. Während die Ergebnisse zur Reduktion der Infektionseffizienz von *Listeria* durch Inhibition des Proteasoms nicht eindeutig zu interpretieren sind, ermöglicht die hier gezeigte Beteiligung von Hakai an der Internalin A vermittelten Invasion von *Listeria* die Erstellung eines erweiterten Infektionsmodells. Weitere Untersuchungen könnten in der Analyse einer Kolo-kalisation von Hakai und *Listeria* in GFP-Hakai transfizierten Zellen bestehen. Von großem Interesse sind in diesem Zusammenhang sicher auch mögliche Synergien zwischen den durch Internalin A und Internalin B eingeleiteten Prozessen in der Wirtszelle. Solche Effekte könnten in Kostimulations-Experimenten untersucht werden.

Nach wie vor wird diskutiert, ob Internalin A neben E-cadherin auch an andere Proteine auf der Wirtszelle binden kann. Die hier ermittelten Ergebnisse legen einen solchen Mechanismus nahe, da eine Aktivierung von Src bisher durch eine Bindung von Internalin A an E-cadherin nicht erklärt werden kann. In diesem Zusammenhang sollte die mögliche Beteiligung anderer Kinasen an der Phosphorylierung von E-cadherin untersucht werden. Ein naheliegender Kandidat für die Phosphorylierung wäre die Rezeptortyrosinkinase c-Met. Die Identifikation der Src-abhängigen Phosphorylierungsstelle in E-cadherin hat nicht nur für die Aufklärung der Internalin A vermittelten Signaltransduktion Bedeutung. Weitere Untersuchungen könnten aufklären, inwiefern die Phosphorylierung von Y753 bei der Invasivität von Tumorzellen relevant ist.

8. Literatur

Alonso A, García-del Portillo F.

Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens.

Int Microbiol. 2004 Sep;7(3):181-91. Review.

Angst BD, Marozzi C, Magee AI.

The cadherin superfamily: diversity in form and function.

J Cell Sci. 2001 Feb;114(Pt 4):629-41. Review.

Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y, Alkalay I.

Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway.

Genes Dev. 2002 May 1;16(9):1066-76.

Bhavsar AP, Guttman JA, Finlay BB.

Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens.

Nature. 2007 Oct 18;449(7164):827-34.

Bierne H, Miki H, Innocenti M, Scita G, Gertler FB, Takenawa T, Cossart P.

WASP-related proteins, Abi1 and Ena/VASP are required for *Listeria* invasion induced by the Met receptor.

J Cell Sci. 2005 Apr 1;118(Pt 7):1537-47. Epub 2005 Mar 15. Erratum in: J Cell Sci. 2005 Apr 15;118(Pt 8):1769.

Bradford MM.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal Biochem. 1976 May 7;72:248-54. No abstract available.

Brady-Kalnay SM, Rimm DL, Tonks NK.

Receptor protein tyrosine phosphatase PTPmu associates with cadherins and catenins in vivo.

J Cell Biol. 1995 Aug;130(4):977-86.

Brehm K, Kreft J, Ripio MT, Vázquez-Boland JA.

Regulation of virulence gene expression in pathogenic *Listeria*.

Microbiologia. 1996 Jun;12(2):219-36. Review. Erratum in: Microbiologia 1996 Sep;12(3):507.

Brown CL, Maier KC, Stauber T, Ginkel LM, Wordeman L, Vernos I, Schroer TA.

Kinesin-2 is a motor for late endosomes and lysosomes.

Traffic. 2005 Dec;6(12):1114-24.

Burnette WN.

"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.

Anal Biochem. 1981 Apr;112(2):195-203. No abstract available.

Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Mees SG, Kemler R, Schalken JA.
Molecular cloning and characterization of the human E-cadherin cDNA.
Mol Biol Rep. 1993 Feb;17(2):123-8.

Cagney G, Emili A.
De novo peptide sequencing and quantitative profiling of complex protein mixtures using mass-coded abundance tagging.
Nat Biotechnol. 2002 Feb;20(2):163-70.

Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG.
Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis.
Electrophoresis. 2004 May;25(9):1327-33.

Cultek,
2007 <http://www.cultek.com>

Chen X, Kojima S, Borisy GG, Green KJ.
p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions.
J Cell Biol. 2003 Nov 10;163(3):547-57.

Chakraborty T, Ebel F, Domann E, Niebuhr K, Gerstel B, Pistor S, Temm-Grove CJ, Jockusch BM, Reinhard M, Walter U, et al.
A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells.
EMBO J. 1995 Apr 3;14(7):1314-21.

Domann E, Wehland J, Rohde M, Pistor S, Hartl M, Goebel W, Leimeister-Wächter M, Wuenscher M, Chakraborty T.
A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin.
EMBO J. 1992 May;11(5):1981-90.

Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI.
Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly.
Cell. 2005 Dec 2;123(5):903-15.

Elsinghorst EA.
Measurement of invasion by gentamicin resistance.
Methods Enzymol. 1994;236:405-20.

Faletto DL, Kaplan DR, Halverson DO, Rosen EM, Vande Woude GF.
Signal transduction in c-met mediated motogenesis.
EXS. 1993;65:107-30. Review.

Fischer R,
Anreicherung und Identifizierung von Phosphopeptiden nach Induktion eucaryontischer Wirtszellen durch putative und bekannte Virulenzfaktoren von *Listeria monocytogenes*
Diplomarbeit. 2004

Fisher
On a distribution yielding the error functions of several well known statistics; 1924

Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, Leddy HE, Behrens J, Sommer T, Birchmeier W.

Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex.

Nat Cell Biol. 2002 Mar;4(3):222-31.

Gaillard JL, Berche P, Frehel C, Gouin E, Cossart P.

Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci.

Cell. 1991 Jun 28;65(7):1127-41.

Garner, M.J., R.D. Hayward, and V. Koronakis

The *Salmonella* pathogenicity island 1 secretion system directs cellular cholesterol redistribution during mammalian cell entry and intracellular trafficking.

Cell. Microbiol. 2002; 4:153–165.

Gatfield and Pieters

Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages.

Science. 2000 Jun 2;288(5471):1647-50.

Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, Rusniok C, Amend A, Baquero F, Berche P, Bloecker H, Brandt P, Chakraborty T, Charbit A, Chetouani F, Couvé E, de Daruvar A, Dehoux P, Domann E, Domínguez-Bernal G, Duchaud E, Durant L, Dussurget O, Entian KD, Fsihi H, García-del Portillo F, Garrido P, Gautier L, Goebel W, Gómez-López N, Hain T, Hauf J, Jackson D, Jones LM, Kaerst U, Kreft J, Kuhn M, Kunst F, Kurapkat G, Madueno E, Maitournam A, Vicente JM, Ng E, Ndjari H, Nordsiek G, Novella S, de Pablos B, Pérez-Díaz JC, Purcell R, Remmel B, Rose M, Schlueter T, Simoes N, Tierrez A, Vázquez-Boland JA, Voss H, Wehland J, Cossart P.

Comparative genomics of *Listeria* species.

Science. 2001 Oct 26;294(5543):849-52.

Hamon MA, Batsché E, Régnault B, Tham TN, Seveau S, Muchardt C, Cossart P.

Histone modifications induced by a family of bacterial toxins.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Aug 14;104(33):13467-72. Epub 2007 Aug 3.

Hamon M, Bierne H, Cossart P.

Listeria monocytogenes: a multifaceted model.

Nat Rev Microbiol. 2006 Jun;4(6):423-34. Review.

Höller D, Dikic I.

Receptor endocytosis via ubiquitin-dependent and -independent pathways.

Biochem Pharmacol. 2004 Mar 15;67(6):1013-7. Review.

- Huber MA, Kraut N, Beug H.
Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression.
Curr Opin Cell Biol. 2005 Oct;17(5):548-58. Review.
- Junttila J, Brander M.
Listeria monocytogenes septicemia associated with consumption of salted mushrooms.
Scand J Infect Dis. 1989;21(3):339-42.
- Jutras, I., L. Abrami, and A. Dautry-Varsat
Entry of the lymphogranuloma venereum strain of *Chlamydia trachomatis* into host cells involves cholesterol-rich membrane domains.
Infect. Immun. 2003; 71:260–266.
- Kaksonen M, Toret CP, Drubin DG.
Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2006 Jun;7(6):404-14. Review.
- Kamei T, Matozaki T, Sakisaka T, Kodama A, Yokoyama S, Peng YF, Nakano K, Takaishi K, Takai Y.
Coendocytosis of cadherin and c-Met coupled to disruption of cell-cell adhesion in MDCK cells--regulation by Rho, Rac and Rab small G proteins.
Oncogene. 1999 Nov 18;18(48):6776-84.
- Kayal S, Charbit A.
Listeriolysin O: a key protein of Listeria monocytogenes with multiple functions.
FEMS Microbiol Rev. 2006 Jul;30(4):514-29. Review.
- Klawonn F, Hundertmark C, Jänsch L
A Maximum Likelihood Approach to Noise Estimation for Intensity Measurements in Biology
Sixth IEEE International Conference on Data Mining - Workshops 2006; 1154-1169.
- Klose, J.
Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals, Humangenetik. 1975; **26** [3], 231-243
- Knudsen KA, Frankowski C, Johnson KR, Wheelock MJ.
A role for cadherins in cellular signaling and differentiation.
J Cell Biochem Suppl. 1998;30-31:168-76. Review.
- Koch J, Stark K.
Significant increase of listeriosis in Germany--epidemiological patterns 2001-2005.
Euro Surveill. 2006;11(6):85-8.
- Kolkman A, Dirksen EH, Slijper M, Heck AJ.
Double standards in quantitative proteomics: direct comparative assessment of difference in gel electrophoresis and metabolic stable isotope labeling.
Mol Cell Proteomics. 2005 Mar;4(3):255-66. Epub 2005 Jan 4.

Küssel-Andermann P, El-Amraoui A, Safieddine S, Nouaille S, Perfettini I, Lecuit M, Cossart P, Wolfrum U, Petit C.

Vezatin, a novel transmembrane protein, bridges myosin VIIA to the cadherin-catenins complex.

EMBO J. 2000 Nov 15;19(22):6020-9.

Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, Pavletich NP.

Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain.

Science. 1996 Nov 8;274(5289):948-53.

Kuhn M.

The microtubule depolymerizing drugs nocodazole and colchicine inhibit the uptake of *Listeria monocytogenes* by P388D1 macrophages.

FEMS Microbiol Lett. 1998 Mar 1;160(1):87-90.

Kyhse-Andersen J.

Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.

J Biochem Biophys Methods. 1984 Dec;10(3-4):203-9.

Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G.

A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation.

J Mol Biol. 1970 Jan 14;47(1):69-85. No abstract available.

Lafont, F., G. Tran Van Nhieu, K. Hanada, P. Sansonetti, and F.G. van der Goot

Initial steps of *Shigella* infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction.

EMBO J. 2002; 21:4449–4457.

Lecuit M, Dramsi S, Gottardi C, Fedor-Chaiken M, Gumbiner B, Cossart P.

A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*.

EMBO J. 1999 Jul 15;18(14):3956-63.

Lecuit M, Ohayon H, Braun L, Mengaud J, Cossart P.

Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization.

Infect Immun. 1997 Dec;65(12):5309-19.

Lee KD, Hollenbeck PJ.

Phosphorylation of kinesin in vivo correlates with organelle association and neurite outgrowth.

J Biol Chem. 1995 Mar 10;270(10):5600-5.

Leimeister-Wächter M, Chakraborty T.

Detection of listeriolysin, the thiol-dependent hemolysin in *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria seeligeri*.

Infect Immun. 1989 Aug;57(8):2350-7.

Lickert H, Bauer A, Kemler R, Stappert J.
Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/beta-catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion.
J Biol Chem. 2000 Feb 18;275(7):5090-5.

Lilien J, Balsamo J.
The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin.
Curr Opin Cell Biol. 2005 Oct;17(5):459-65. Review.

Lock JG, Stow JL.
Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin.
Mol Biol Cell. 2005 Apr;16(4):1744-55. Epub 2005 Feb 2.

Machner M.
Untersuchungen zur Struktur und Funktion der Virulenzfaktoren ActA und Internalin B des humanpathogenen Bakteriums *Listeria monocytogenes*.
Dissertation 2002; TU-Braunschweig

Machner MP, Urbanke C, Barzik M, Otten S, Sechi AS, Wehland J, Heinz DW.
ActA from *Listeria monocytogenes* can interact with up to four Ena/VASP homology 1 domains simultaneously.
J Biol Chem. 2001 Oct 26;276(43):40096-103. Epub 2001 Aug 6.

Madshus IH.
Ubiquitin binding in endocytosis--how tight should it be and where does it happen?
Traffic. 2006 Mar;7(3):258-61. Erratum in: Traffic. 2006 Jul;7(7):927.

Maly DJ, Allen JA, Shokat KM.
A mechanism-based cross-linker for the identification of kinase-substrate pairs.
J Am Chem Soc. 2004 Aug 4;126(30):9160-1. No abstract available.

Martin K, Steinberg TH, Cooley LA, Gee KR, Beechem JM, Patton WF.
Quantitative analysis of protein phosphorylation status and protein kinase activity on microarrays using a novel fluorescent phosphorylation sensor dye.
Proteomics. 2003 Jul;3(7):1244-55.

Matsuzawa T, Kuwae A, Yoshida S, Sasakawa C, Abe A.
Enteropathogenic *Escherichia coli* activates the RhoA signaling pathway via the stimulation of GEF-H1.
EMBO J. 2004 Sep 1;23(17):3570-82. Epub 2004 Aug 19.

May RC, Hall ME, Higgs HN, Pollard TD, Chakraborty T, Wehland J, Machesky LM, Sechi AS.
The Arp2/3 complex is essential for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*.
Curr Biol. 1999 Jul 15;9(14):759-62.

- Mengaud J, Ohayon H, Gounon P, Mege R-M, Cossart P.
E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells.
Cell. 1996 Mar 22;84(6):923-32.
- Miravet S, Piedra J, Castaño J, Raurell I, Francí C, Duñach M, García de Herreros A.
Tyrosine phosphorylation of plakoglobin causes contrary effects on its association with desmosomes and adherens junction components and modulates beta-catenin-mediated transcription.
Mol Cell Biol. 2003 Oct;23(20):7391-402.
- Morimoto A, Okamura K, Hamanaka R, Sato Y, Shima N, Higashio K, Kuwano M.
Hepatocyte growth factor modulates migration and proliferation of human microvascular endothelial cells in culture.
Biochem Biophys Res Commun. 1991 Sep 16;179(2):1042-9.
- Muschal S,
Strategie zur Charakterisierung des c-Met-Rezeptorkomplexes durch Strep-InIB.
Diplomarbeit. 2006
- Nusrat A, Parkos CA, Verkade P, Foley CS, Liang TW, Innis-Whitehouse W, Eastburn KK, Madara JL.
Tight junctions are membrane microdomains.
J Cell Sci. 2000 May;113 (Pt 10):1771-81.
- Pece S, Gutkind JS.
E-cadherin and Hakai: signalling, remodeling or destruction?
Nat Cell Biol. 2002 Apr;4(4):E72-4. No abstract available.
- O'Farrell, P. H.
High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.
J.Biol.Chem. 1975; 250 [10], 4007-4021, (1975)
- Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M.
Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics.
Mol Cell Proteomics. 2002 May;1(5):376-86.
- Palacios F, Tushir JS, Fujita Y, D'Souza-Schorey C.
Lysosomal targeting of E-cadherin: a unique mechanism for the down-regulation of cell-cell adhesion during epithelial to mesenchymal transitions.
Mol Cell Biol. 2005 Jan;25(1):389-402.
- Paterson AD, Parton RG, Ferguson C, Stow JL, Yap AS.
Characterization of E-cadherin endocytosis in isolated MCF-7 and chinese hamster ovary cells: the initial fate of unbound E-cadherin.
J Biol Chem. 2003 Jun 6;278(23):21050-7. Epub 2003 Mar 25.
- Pentecost M, Otto G, Theriot JA, Amieva MR.
Listeria monocytogenes invades the epithelial junctions at sites of cell extrusion.
PLoS Pathog. 2006 Jan;2(1):e3. Epub 2006 Jan 27.

Piedra J, Miravet S, Castaño J, Pálmer HG, Heisterkamp N, García de Herreros A, Duñach M.

p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction.

Mol Cell Biol. 2003 Apr;23(7):2287-97.

Pierce A, Unwin RD, Evans CA, Griffiths S, Carney L, Zhang L, Jaworska E, Lee CF, Blinco D, Okoniewski MJ, Miller CJ, Bitton DA, Spooner E, Whetton AD.

Eight-channel iTRAQ enables comparison of the activity of 6 leukaemogenic tyrosine kinases.

Mol Cell Proteomics. 2007 Oct 21; [Epub ahead of print]

Pizarro-Cerdá J, Cossart P.

Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*.

J Pathol. 2006 Jan;208(2):215-23. Review.

Rabilloud T, Strub JM, Luche S, van Dorsselaer A, Lunardi J.

A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels.

Proteomics. 2001 May;1(5):699-704.

Rollason R, Korolchuk V, Hamilton C, Schu P, Banting G.

Clathrin-mediated endocytosis of a lipid-raft-associated protein is mediated through a dual tyrosine motif.

J Cell Sci. 2007 Nov 1;120(Pt 21):3850-8. Epub 2007 Oct 16.

Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlett-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin DJ.

Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents.

Mol Cell Proteomics. 2004 Dec;3(12):1154-69. Epub 2004 Sep 22.

Sachs JH

InlA / InlB-abhängige Rekrutierung von Adaptorproteinen an E-Cadherin / c-Met während der Invasion von *Listeria monocytogenes* in humane Epithelzellen", Studienarbeit, HZI Braunschweig, 2007

Sadot E, Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Shnizer D, Lando Z, Zharhary D, Kam Z, Ben-Ze'ev A, Geiger B.

Regulation of S33/S37 phosphorylated beta-catenin in normal and transformed cells.

J Cell Sci. 2002 Jul 1;115(Pt 13):2771-80.

Schubert WD, Urbanke C, Ziehm T, Beier V, Machner MP, Domann E, Wehland J, Chakraborty T, Heinz DW.

Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin.

Cell. 2002 Dec 13;111(6):825-36.

- Scott JA, Shewan AM, den Elzen NR, Loureiro JJ, Gertler FB, Yap AS.
Ena/VASP proteins can regulate distinct modes of actin organization at cadherin-adhesive contacts.
Mol Biol Cell. 2006 Mar;17(3):1085-95. Epub 2005 Dec 21.
- Seveau S, Bierne H, Giroux S, Prévost MC, Cossart P.
Role of lipid rafts in E-cadherin-- and HGF-R/Met--mediated entry of *Listeria monocytogenes* into host cells.
J Cell Biol. 2004 Aug 30;166(5):743-53.
- Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grübel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA.
Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins.
Nature. 1995 Mar 23;374(6520):327-37.
- Shen Y, Naujokas M, Park M, Ireton K.
InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase.
Cell. 2000 Oct 27;103(3):501-10.
- Shin, J.S., Z. Gao, and S.N. Abraham
Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells.
Science. 2000; 289:785–788.
Singleton P., *Bacteria* 2004
- Sousa S, Cabanes D, Archambaud C, Colland F, Lemichez E, Popoff M, Boisson-Dupuis S, Gouin E, Lecuit M, Legrain P, Cossart P.
ARHGAP10 is necessary for alpha-catenin recruitment at adherens junctions and for *Listeria* invasion.
Nat Cell Biol. 2005 Oct;7(10):954-60. Epub 2005 Sep 25.
- Sousa S, Cabanes D, Bougnères L, Lecuit M, Sansonetti P, Tran-Van-Nhieu G, Cossart P.
Src, cortactin and Arp2/3 complex are required for E-cadherin-mediated internalization of *Listeria* into cells.
Cell Microbiol. 2007 Nov;9(11):2629-43. Epub 2007 Jul 11.
- Taher TE, Tjin EP, Beuling EA, Borst J, Spaargaren M, Pals ST.
c-Cbl is involved in Met signaling in B cells and mediates hepatocyte growth factor-induced receptor ubiquitination.
J Immunol. 2002 Oct 1;169(7):3793-800.
- Tang P, Rosenshine I, Cossart P, Finlay BB.
Listeriolysin O activates mitogen-activated protein kinase in eucaryotic cells.
Infect Immun. 1996 Jun;64(6):2359-61.
- Tsukamoto T, Nigam SK.
Cell-cell dissociation upon epithelial cell scattering requires a step mediated by the proteasome.
J Biol Chem. 1999 Aug 27;274(35):24579-84.

Unlü M, Morgan ME, Minden JS.

Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts.

Electrophoresis. 1997 Oct;18(11):2071-7.

Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J.

Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants.

Clin Microbiol Rev. 2001 Jul;14(3):584-640. Review.

Veiga E, Cossart P.

Listeria hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells.

Nat Cell Biol. 2005 Sep;7(9):894-900. Epub 2005 Aug 21.

Veiga E, Guttman JA, Bonazzi M, Boucrot E, Toledo-Arana A, Lin AE, Enninga J, Pizarro-Cerdá J, Finlay BB, Kirchhausen T, Cossart P.

Invasive and adherent bacterial pathogens co-Opt host clathrin for infection.

Cell Host Microbe. 2007 Nov 15;2(5):340-51.

Wahl JK 3rd, Kim YJ, Cullen JM, Johnson KR, Wheelock MJ.

N-cadherin-catenin complexes form prior to cleavage of the proregion and transport to the plasma membrane.

J Biol Chem. 2003 May 9;278(19):17269-76. Epub 2003 Feb 25.

Wessel D, Flügge UI.

A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids.

Anal Biochem. 1984 Apr;138(1):141-3.

Wollert T, Pasche B, Rochon M, Deppenmeier S, van den Heuvel J, Gruber AD, Heinz DW, Lengeling A, Schubert WD.

Extending the host range of Listeria monocytogenes by rational protein design.

Cell. 2007 Jun 1;129(5):891-902.

Xu G, Arregui C, Lilien J, Balsamo J.

PTP1B modulates the association of beta-catenin with N-cadherin through binding to an adjacent and partially overlapping target site.

J Biol Chem. 2002 Dec 20;277(51):49989-97. Epub 2002 Oct 10.

Yamada KM, Geiger B.

Molecular interactions in cell adhesion complexes.

Curr Opin Cell Biol. 1997 Feb;9(1):76-85. Review.

Yang JY, Zong CS, Xia W, Wei Y, Ali-Seyed M, Li Z, Broglio K, Berry DA, Hung MC.

MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation.

Mol Cell Biol. 2006 Oct;26(19):7269-82.

Yu A, Malek TR.

The proteasome regulates receptor-mediated endocytosis of interleukin-2.

J Biol Chem. 2001 Jan 5;276(1):381-5.

Zheng ZH, Sun XJ, Zhou HT, Shang C, Ji H, Sun KL.
Analysis of metastasis suppressing function of E-cadherin in gastric cancer cells by RNAi.
World J Gastroenterol. 2005 Apr 7;11(13):2000-3.

Zhou G, Li H, DeCamp D, Chen S, Shu H, Gong Y, Flaig M, Gillespie JW, Hu N, Taylor PR, Emmert-Buck MR, Liotta LA, Petricoin EF 3rd, Zhao Y.
2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers.
Mol Cell Proteomics. 2002 Feb;1(2):117-24.

Hiermit bedanke ich mich ausdrücklich bei Prof. Wehland für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in der Abteilung Zellbiologie am HZI in Braunschweig anfertigen zu können. Weiterhin danke ich ihm und Prof. Steinert für die Übernahme des Referates bzw. des Koreferates, sowie Prof. Dersch für die Leitung der Prüfungskommission.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Lothar Jänsch für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit. Ohne die zahlreichen wissenschaftlichen Ratschläge und Diskussionen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Dr. Uwe Kärst und Dr. Josef Wissing danke ich für unermüdliche Hilfestellungen in theoretischen und praktischen Dingen des wissenschaftlichen Alltags.

Prof. Frank Klawonn und Claudia Hundertmark gilt mein Dank für die anhaltenden Versuche, mathematische Präzision in die heuristische Denkweise eines Naturwissenschaftlers zu bringen.

Dr. Manfred Nimtz danke ich für die Unterstützung bei der Interpretation von Massenspektren und die immer bereitwillige Übernahme der Rolle des Advocatus diaboli bei den Diskussionen zur iTRAQ™-Validierung.

Meinen Mitstreitern bei der Erlangung der Doktorwürde Tobias Reinl, Claudia Hundertmark, Sebastian König und Sofia Magnowska danke ich für viele anregende Diskussionen und dafür, dass es nie langweilig wurde.

Kirsten Minkhart danke ich für ihren außergewöhnlichen Einsatz bei der Umsetzung massenspektrometrischer Analysen, sowie Reiner Munder, Undine Felgenträger und Hedwig Schrader für die technische Unterstützung und Anleitung.

Dr. Christian Erk und Marlies Konradt danke ich für die Herstellung eines phosphospezifischen E-cadherin Antikörpers.

Dr. Thomas Wollert und Stefan Muschal danke ich für die Bereitstellung und Klonierung diverser Internalin-Konstrukte.

Jan-Henrich Sachs und Heinrich Schlums danke ich für ihre Arbeit an der Charakterisierung diverser Internalin A-Derivate.

Meiner Familie danke ich für ihre immer geduldige Unterstützung in allen Lebenslagen. Die Wissenschaft ist zwar eine Berufung, doch wäre diese Arbeit ohne den kompromisslosen Rückhalt durch meine Verlobte Sonja nie möglich gewesen.

DANKE!